GLYCEROPHOSPHAT- UND LACTAT-DEHYDROGENASE AUS KANINCHENMUSKEL IN VITRO UND IN SITU

-Gleichgewichte, Relaxationskonstanten, Flußraten-

Walter Rüßmann

1967

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität
München
Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. Th. Bücher

Glycerophosphat- und Lactat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel in vitro und in situ
- Gleichgewichte, Relaxationskonstanten, Flußraten -

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Walter Rüßmann
aus
Wuppertal-Elberfeld

München
1967

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. Dr.h.c. Th. Bücher
Dekan: Professor Dr. M. Kiese

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MEINEN ELTERN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546019_0007

Meinem Lehrer,
Herrn Professor Dr. Dr.h.c. Theodor BÜCHER,
danke ich für Anregung und Förderung
dieser Arbeit
und für die Unterweisung
in den Methoden.

Inhalt

		Seite
0.	Abkürzungen und Symbole	2
1.	Einleitung	5
2.	Glycerophosphat- und Lactat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel in vitro und in situ	7
2.1	Gleichgewichtskonstanten	7
2.11	Allgemeine Beziehungen	7
2.12	Messungen	9
2.2	Relaxationskonstanten	13
2.21	Grundlagen	13
2.22	Relaxationsmessungen	17
2.3	Ungleichgewichte und Flußraten im Kaninchenmuskel	20
3.	Tabellen und Figuren	26
4.	Diskussion	44
5.	Arbeitsmethoden	46
6.	Zusammenfassung	52
7.	Schrifttum	53

Lebenslauf

0. Abkürzungen und Symbole

α	Dissoziationsgrad
A	Kosubstrat (NADH)
A^-	Anion, Säurerest
a_A, a_B,...	thermodynamische Aktivitäten von A, B,...
aH^+	Wasserstoffionenaktivität
AH	Säure
B	Substrat (DAP bzw. Pyr)
c_i	Konzentration einer Ionenart
δ	Gleichgewichtsauslenkung (Gleichung (43))
Δ	Gleichgewichtsauslenkung
Δ_{st}	stationäre Gleichgewichtsauslenkung der Zelle
DAP	Dihydroxyacetonphosphat
d	Schichtdicke
E	Enzym (GDH)
$\bar{E}$	Grundpotential
E_h	Ist-Potential
$E_{A/Q}$	Grundpotential NADH/NAD^+
$E_{P/B}$	Grundpotential α-GP/DAP bzw. Lac/Pyr
EA, EQ	Enzym-Substrat- bzw. -Produkt-Komplexe
(EAB-EPQ)	zentrale Komplexe zwischen Enzym und Partnern
F	Enzym (LDH) elektrochemisches Äquivalent, Faraday
f_A, f_B,...	Aktivitätskoeffizienten
F_N	2,3026 RT/F
FA, FQ	Enzym-Substrat- bzw. -Produkt-Komplexe
(FAB-FPQ)	zentrale Komplexe zwischen Enzym und Partnern
Γ	Ungleichgewicht
ΔG^o	Standardenergie
ΔG	Grundreaktionsarbeit
$\Delta G'$	Gesamtarbeitsfähigkeit

GDH	Glycerophosphat-Dehydrogenase
α-GP	α-Glycerophosphat
H^+	Wasserstoffionen
I	Ionenstärke
κ	Relaxationskonstante (Gleichung (43))
°K	Grad Kelvin
K^+	Kaliumionen
k_1, k_2,...	Reaktionskonstanten
K_A, K_B,...	MICHAELIS-Konstanten
K_{IA}, K_{IB},...	Konstanten der Substrat- bzw. Produkthemmung
K_{cG}, K_{cL}, K_{cM}	scheinbare Gleichgewichtskonstanten der GDH-, LDH- und MDH-Reaktion $([\bar{P}][\bar{Q}])/([\bar{A}][\bar{B}])$
K_G, K_L	pH-unabhängige scheinbare Gleichgewichtskonstanten der GDH- und LDH-Reaktion $(a_{H^+}[\bar{A}][\bar{B}])/([\bar{P}][\bar{Q}])$
K_{aG}, K_{aL}	thermodynamische Gleichgewichtskonstanten der GDH- und LDH-Reaktion
K_G^o, K_L^o, K_M^o	pH-unabhängige thermodynamische Gleichgewichtskonstanten der GDH-, LDH- und MDH-Reaktion
k_{ss}	Relaxationskonstante
$(k_{ss})_{Exp.}$	Relaxationskonstante im Modellversuch
$(k_{ss})_{Gewebe}$	Relaxationskonstante des Gewebsenzyms
L	Leistung
Lac	Lactat
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MDH	Malat-Dehydrogenase
MDH-NADH	MDH-Kosubstrat-Komplex
n	Zahl der Ladungen bzw. Elektronenübergänge
NAD^+	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduziert
P	Produkt (α-GP bzw. Lac)
pH	Wasserstoffionenexponent
pK	negativer Logarithmus der thermodynamischen Dissoziationskonstanten

pK'	negativer Logarithmus der stöchiometrischen Dissoziationskonstanten
Pyr	Pyruvat
Q	Koprodukt (NAD^+)
R	Gaskonstante
r_i	Ionenradius
Σ	Summe
t	Zeit
T	absolute Temperatur
T'	298° K
V	Volumen eines Testansatzes
V_1	Maximalgeschwindigkeit der "Hinreaktion" (Substratkonzentrationen im Sättigungsbereich, Produktkonzentrationen = 0) Enzymaktivitäten im Standardtest
V_2	Maximalgeschwindigkeit der "Rückreaktion" (Produktkonzentrationen im Sättigungsbereich, Substratkonzentrationen = 0)
$V_{1\,G}$, $V_{1\,L}$	Enzymaktivitätsgehalte an GDH und LDH
$(V_1)_{Exp.}$	Enzymaktivität in vitro
$(V_1)_{Gewebe}$	Enzymaktivitätsgehalte
z_A,...	Wertigkeit von Ion A
z_i	Wertigkeit einer Ionenart
φ	Konstante der Theorie von DEBYE und HÜCKEL
{A}, {B},...	Metabolitgehalte
$\{\bar{A}\}$, $\{\bar{B}\}$,...	Gleichgewichtsgehalte
[A], [B],...	beliebige Partner (Metabolit)-Konzentrationen
$[\bar{A}]$, $[\bar{B}]$,...	Gleichgewichtskonzentrationen

1. Einleitung

Glycerophosphat- und Lactat-Dehydrogenase sind Enzyme der Zellen. Beide erfüllen Aufgaben in dem zellulären Wasserstofftransportsystem. Sie sind aus Geweben rein dargestellt worden. In diesem Arbeitskreis wurden die kristallisierten Enzyme präparativ und analytisch erforscht(1).

Die Tatsache, daß die von diesen beiden Enzymen katalysierten Reaktionen dem EMBDEN-MEYERHOF-Schema der Glykolyse - dem extramitochondrial lokalisierten System des energieliefernden Stoffwechsels - angegliedert sind,ist allgemein bekannt. Die jüngere Forschung hat hier mehr und mehr nach dem quantitativen Zusammenspiel solcher Einzelreaktionen mit der übrigen glykolytischen Kette in der lebenden Zelle (in situ) gefragt. Mit diesem Fragen hat sich aus einer weitgehend deskriptiv orientierten Biochemie die Zellphysiologie entwickelt. Diese Forschungsrichtung arbeitet mit einer Reihe analytischer Verfahren (Übersicht vgl. (7)), nach denen etwa möglichst schonend hergestellte Gewebsextrakte auf Enzymaktivitäts- und Zwischenstoffgehalte untersucht werden. Ergebnisse solcher Analysen können über die wechselseitige Abstimmung der einzelnen Enzymaktivitäten in einem Abschnitt einer Stoffwechselkette (proportionskonstante Gruppen (vgl. 35, 36)) und über die Redoxbeziehungen einzelner Metabolite (6) Aufschluß geben.

Bereits für die Berechnung zellulärer Redoxpotentiale sind neben den analytischen Daten (Metabolitgehalten) auch die in vitro gemessenen Gleichgewichtskonstanten der betreffenden Reaktionen notwendig (19). Dabei hat sich gezeigt, daß nicht nur die Temperatur des tierischen Gewebes sondern auch die zellulären Wasserstoffkonzentrationen, Ionenstärken und Ionenmilieus in vitro nachgeahmt werden müssen. Über diese Größen ist noch so wenig bekannt, daß man gezwungen ist, bei der Messung der Gleichgewichte ein ganzes Spektrum von Modellbedingungen zu versuchen. Dies ist in der vorliegenden Arbeit für Glycerophosphat- und Lactat-Dehydrogenase-Reaktion geschehen.

Werden Metabolitanalysen nach Ischämie (Rattenleber (21, 22)) oder nach tetanischer Kontraktion (Bauchmuskel der Ratte (20))

durchgeführt und dann aus der Zunahme des Lactat- bzw. Glycerophosphat-Gehaltes die in situ möglichen Flußraten in den von Lactat- bzw. Glycerophosphat-Dehydrogenase katalysierten Reaktionen berechnet, so zeigt sich, daß diese Werte um ein bis zwei Größenordnungen unter den im standardisierten optischen Test (8) ermittelten Enzymaktivitätsgehalten liegen. Die Ursache für diese Diskrepanz ist in dem relativ unphysiologischen Milieu des Standardtestes zu suchen.

Die Aktivität einer gegebenen Enzymmenge wird durch die Größe der kinetischen Konstanten des Enzyms und durch die Konzentration seiner Reaktionspartner bestimmt. Der Wert der kinetischen Konstanten hängt von den Milieubedingungen ab. Ist es möglich diese Vielzahl verschiedener Veränderlicher in einem leicht meßbaren Korrekturfaktor zusammenzufassen, der es gestattet, die Enzymaktivitäten so unterschiedlicher Bedingungen wie Standardtest und Zellmilieu einfach in einander umzurechnen? BÜCHER und RÜSSMANN (9, 39) bedienten sich in diesem Zusammenhang der Relaxationskonstanten und der zellulären Gleichgewichtsauslenkungen der jeweiligen Reaktionen. Sie erzielten brauchbare Korrekturfaktoren mit Annäherung der Größenordnung. Die Relaxationskonstanten fassen die kinetischen Daten der Enzyme für gegebene Gleichgewichtskonzentrationen der Reaktionspartner zusammen. Die Konstanten werden unter verschiedenen Modellbedingungen (Ionenstärke, pH, Metabolitkonzentrationen) in vitro mit den aus Kaninchenmuskel kristallisierten Enzymen gemessen. Die zelluläre Gleichgewichtsauslenkung ließ sich aus den Metabolitgehalten mit Hilfe der in vitro bestimmten Gleichgewichtskonstanten abschätzen.

In den zitierten Veröffentlichungen wurden Relaxationskonstanten aus in vitro-Modellen mit Kaninchenmuskelenzymen auf die Verhältnisse der Leber und des Bauchmuskels der Ratte übertragen. Inzwischen sind Enzymaktivitätsmuster (35, 36) und Metabolitstudien (28) zum roten und weißen Skelettmuskel des Kaninchens bekannt. Die vorliegende Arbeit benutzt dieses neue Material und erörtert die Theorie der Relaxationskonstanten des Ordered Bi Bi-Mechanismus der enzymatischen Vier-Partner-Reaktion (12). Hinsichtlich der enzymatischen Zwei-Partner-Reaktion (Enolase) sei auf neue Ergebnisse von SIES (40) verwiesen.

2. Glycerophosphat- und Lactat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel in vitro und in situ.

Glycerophosphat-Dehydrogenase katalysiert die Reaktion (GDH-Reaktion)

$$NADH + H^+ + DAP \xrightleftharpoons{GDH} \alpha\text{-GP} + NAD^+, \qquad (1)$$

Lactat-Dehydrogenase analog (LDH-Reaktion)

$$NADH + H^+ + Pyr \xrightleftharpoons{LDH} Lac + NAD^+. \qquad (2)$$

2.1 Gleichgewichtskonstanten

2.11 Allgemeine Beziehungen

Für eine gegebene Wasserstoffionenaktivität (aH^+) lassen sich die Gleichungen (1) und (2) allgemein

$$A + B \xrightleftharpoons{Enzym} P + Q \qquad (3)$$

formulieren. Werden mit $[\bar{A}]$, $[\bar{B}]$, ... die Gleichgewichtskonzentrationen der Reaktionspartner und mit $a_{\bar{A}}$, $a_{\bar{B}}$, ... die entsprechenden thermodynamischen Aktivitäten bezeichnet, so bedeutet

$$K_c = \frac{[\bar{P}][\bar{Q}]}{[\bar{A}][\bar{B}]} \qquad (4)$$

die scheinbare und

$$K_a = \frac{a_{\bar{P}}\, a_{\bar{Q}}}{a_{\bar{A}}\, a_{\bar{B}}} = \frac{[\bar{P}]f_P\ [\bar{Q}]f_Q}{[\bar{A}]f_A\ [\bar{B}]f_B} \qquad (5)$$

die thermodynamische Gleichgewichtskonstante. f_A, f_B, ... sind Aktivitätskoeffizienten.

Die große allgemeine Bedeutung von K_a zeigt sich deutlich in

folgenden Gleichungen (31):

$$\Delta G^{o} = - RT' \ln K_a \quad \text{(gültig für molaren Formelumsatz, T' 298° K, p 1 atm.)} \tag{6}$$

$$\Delta G = - RT \ln K_a \tag{7}$$

$$\Delta G' = \Delta G - RT \ln \frac{a_P\, a_Q}{a_A\, a_B} = RT \ln \frac{\Gamma}{K_a} \tag{8}$$

$$L = V_{st}\, RT \ln \frac{\Gamma}{K_a} \quad \text{(L Leistung (Arbeit/Zeit), } V_{st} \text{ Stromstärke (Mole/Zeit))} \tag{9}$$

$$E_h = \bar{E} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\overline{NAD^+}}}{a_{\overline{NADH}}} = \bar{E} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{aH^+ a_{\bar{B}}}{K_a\, a_{\bar{P}}} \tag{10}$$

$$- E_{P/B} = \lg \frac{aH^+}{K_c}\, 10^7\, \frac{F_N}{n} - E_{A/Q} \tag{11}$$

Gleichung (6) gestattet die Berechnung der Standardenergie, Gleichung (7) die der Grundreaktionsarbeit bei verschiedenen Temperaturen. Aus Gleichung(8) ergibt sich die Gesamtarbeitsfähigkeit, aus Gleichung (9) die zur Aufrechterhaltung stationärer Ungleichgewichte erforderliche Leistung (3,29). Mit Gleichung (10) lassen sich bei gegebenen zellulären Metabolitgehalten {DAP}/{α-GP} bzw. {Pyr}/{Lac} und geringen Abweichungen vom Massenwirkungsgleichgewicht die Redoxpotentiale der Kosubstrate NAD^+, NADH für den betreffenden Lösungsraum der Zelle abschätzen (21,22). Die Grundpotentiale α-GP/DAP bzw. Lac/Pyr errechnen sich bei bekanntem NADH/NAD^+-Potential für pH 7.0 mit der Gleichgewichtskonstanten K_c nach Gleichung (11).

Die nach Grundgleichung (3) definierten Gleichgewichtskonstanten (Gleichungen (4) und (5)) ändern ihren Wert in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenaktivität. Für eine allgemeinere Untersuchung ist eine erweiterte Definition zweckmäßig:

$$K_G = \frac{aH^+}{K_{cG}} = \frac{aH^+ [\overline{NADH}]\,[\overline{DAP}]}{[\overline{\alpha\text{-}GP}]\,[\overline{NAD^+}]} \tag{12}$$

$$K_L = \frac{aH^+}{K_{cL}} = \frac{aH^+ [\overline{NADH}]\,[\overline{Pyr}]}{[\overline{Lac}]\,[\overline{NAD^+}]} \tag{13}$$

$$K_G^o = \frac{aH^+}{K_{\alpha G}} = \frac{aH^+ a_{NADH}\ a_{DAP}}{a_{\alpha\text{-}GP}\ a_{NAD^+}} \qquad (14)$$

$$K_L^o = \frac{aH^+}{K_{\alpha L}} = \frac{aH^+ a_{NADH}\ a_{Pyr}}{a_{Lac}\ a_{NAD^+}} \qquad (15)$$

Vorwiegend als K_G und K_L im Sinne der Gleichungen (12) und (13) sind die Gleichgewichtskonstanten wiederholt gemessen worden (Übersicht bei HOHORST (19)). Die unter in vitro-Bedingungen in unphysiologischem Milieu bestimmten Konstanten wurden auf den komplex zusammengesetzten Zellraum übertragen. Dabei blieben mögliche Änderungen der zellulären Wasserstoffionenaktivität (4) ebenso wie die Ionenstärke des Zellmilieus weitgehend außer Betracht.

2.12 Messungen

Eigene Gleichgewichtsmessungen nahmen wir in KH_2PO_4-K_2HPO_4- und in Imidazol-Puffern mit verschiedenen Wasserstoffionenaktivitäten und Ionenstärken bei 37° C vor. Die Ergebnisse unserer Messungen sind als pH-unabhängige Konstanten (aH^+/K_c) in den Tabellen 1 bis 6 wiedergegeben. Die Konstanten variieren in Abhängigkeit von der Ionenstärke. Der Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen wird in den Figuren 1 bis 3 deutlich.

In diesen Figuren fällt die wechselnde Steigung der Ausgleichsgeraden auf. Die Beziehungen zwischen Gleichgewichtskonstanten und Ionenstärken werden von der Theorie DEBYEs und HÜCKELs (13) erfaßt. Danach besteht zwischen der thermodynamischen Aktivität eines Stoffes und seiner Konzentration eine Relation

$$a_{\bar{A}} = f_A\,[\bar{A}] \qquad (16)$$

Für sehr geringe Ionenstärken bis 0,005 Mol/l ergibt sich für den Aktivitätskoeffizienten f_A die Gleichung

$$-\lg f_A = z_A^2 \varphi \sqrt{I} \qquad (17)$$

z_A Wertigkeit des Ions A, Ionenstärke $I = \frac{1}{2}\Sigma c_i z_i^2$,
φ Konstante, bei 25° C 0,509, bei 37° C 0,522.

Bei höheren Werten von I bis 0,1 Mol/l gilt (24,23)

$$- \lg f_A = z_A^2 \varphi \frac{\sqrt{I}}{1 + 3{,}3\ 10^7\ r_i \sqrt{I}} \qquad (18)$$

und mit einem mittleren Ionenradius r_i von 5 Å (41)

$$- \lg f_A = z_A^2 \varphi \frac{\sqrt{I}}{1 + 1{,}6 \sqrt{I}} \qquad (19)$$

Mit Gleichung (5) erhalten die Gleichungen (14) und (15) die allgemeine Form

$$K^o = \frac{aH^+ f_A f_B}{K_c f_P f_Q} \qquad (20)$$

Durch entsprechende Substitution der Aktivitätskoeffizienten (Gleichung (19)) findet man

$$\lg K^o = \lg \frac{aH^+}{K_c} + (z_Q^2 - z_A^2)\varphi \frac{\sqrt{I}}{1 + 1{,}6 \sqrt{I}}, \qquad (21)$$

da bei der GDH- und der LDH-Reaktion $f_B = f_P$. Für die Auswertung ist eine weitere Umformung zweckmäßig, in der formal die pH-unabhängige Gleichgewichtskonstante abhängige Variable der HÜCKELschen Korrektur $\sqrt{I}/(1 + 1{,}6 \sqrt{I})$ ist:

$$\lg \frac{aH^+}{K_c} = \lg K^o + (z_A^2 - z_Q^2)\varphi \frac{\sqrt{I}}{1 + 1{,}6 \sqrt{I}} \qquad (22)$$

Dieser Funktion entspricht bei Auftragung von aH^+/K_c in einer lg-Skala und von $\sqrt{I}/(1 + 1{,}6 \sqrt{I})$ in einer linearen Skala eine Gerade. Ihr Ordinatenabschnitt bei I 0 Mol/l ist K^o, ihre Steigung $(z_A^2 - z_Q^2)\varphi$. Die unter den verschiedenen Versuchsbedingungen aus den Figuren 1 bis 3 abgelesenen Werte für $(z_A^2 - z_Q^2)\varphi$ findet man in Tabelle 7. Ihre wechselnde Größe ist mit diesen Überlegungen noch nicht erklärt.

Die Theorie DEBYEs und HÜCKELs gilt für starke, d.h. vollständig dissoziierte Elektrolyte. Unterschiedlich starke elektrolytische Dissoziation der Reaktionspartner beeinflußt den Wert der Gleichgewichtskonstanten. In diesem Zusammenhang ist der als

$$\alpha = \frac{[A^-]}{[A^-] + [AH]} \qquad (23)$$

definierte Dissoziationsgrad von Interesse. Seine Größe kann nach

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pK - pH}} \qquad (24)$$

berechnet werden (33). Die pK-Werte sind erst für wenige Zwischenstoffe des Zellstoffwechsels bekannt. Einen gewissen Ersatz bieten die pK', d.h. die für 25° C und eine Ionenstärke von etwa 0,1 Mol/l angegebenen stöchiometrischen Konstanten, auch Gebrauchskonstanten genannt. Zwischen pK- und pK'-Werten besteht folgende Beziehung (32):

$$pK_A = pK_A' - \lg f_A \qquad (25)$$

Für α-GP ist pK_1' 1.40, pK_2' 6.44, für DAP pK_1' 1.77, pK_2' 6.45. (37). Bei pH 6.16, der höchsten Wasserstoffionenaktivität unserer Messungen, sind die primären sauren Gruppen vollständig dissoziiert. Für die sekundären Phosphatgruppen ergibt sich bei α-GP und DAP nahezu derselbe Dissoziationsgrad; der Quotient $[\overline{\alpha\text{-GP}}]/[\overline{DAP}]$ der Gleichung(5) ändert also seinen Wert nicht. Die pK'-Werte für Lac und Pyr werden mit 3.17 und 2.25 angegeben (37). Danach ist der Dissoziationsrest schon bei pH 6.16 so klein, daß diese beiden Metabolite als vollständig dissoziiert angesehen werden können. Leider fehlen die pK' von NADH und NAD^+; eine analoge Diskussion ist deshalb nicht möglich. Soweit sich bei den verfügbaren stöchiometrischen Dissoziationskonstanten übersehen läßt, können diese Überlegungen die unterschiedlichen Steigungen der Ausgleichsgeraden in den Figuren 1 bis 3 nicht erklären.

Wir haben in diesem Zusammenhang ferner an eine Komplexbildung zwischen den Pufferkomponenten und den Reaktionspartnern gedacht. In der Literatur haben wir dafür im Fall der in unseren Ansätzen verwendeten Stoffe keine Hinweise gefunden. Immerhin liegen die scheinbaren Gleichgewichtskonstanten (K_c) in den Imidazol-Puffern unter den Werten in vergleichbaren Phosphat-Puffern. Am deutlichsten sind diese Ergebnisse bei der GDH-Reaktion. Vermutlich ist die aus diesen Resultaten abzulesende Verschiebung des Gleichgewichts nach der Seite NADH und DAP

auf eine Komplexbildung eines dieser oder beider Reaktionspartner mit Imidazol zurückzuführen.

BURTON und WILSON (10) fanden ohne Berücksichtigung der HÜCKELschen Korrektur $\sqrt{I}/(1 + 1{,}6\ \sqrt{I})$ für die MDH-Reaktion

$$\lg \frac{a_{H^+}}{K_{cM}} = \lg K_M^o + 0{,}7\ \sqrt{I} \qquad (26)$$

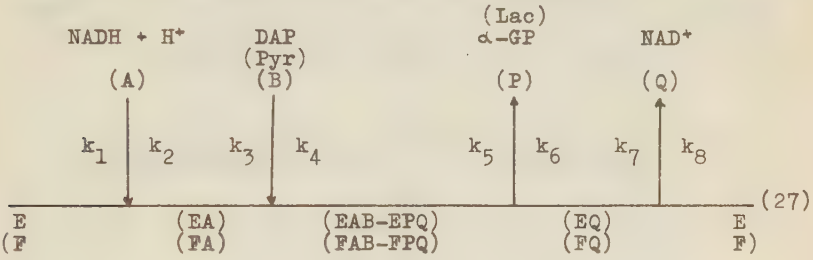
Der in ihren Versuchen gefundene Parameter von 0,7 entsprach der Theorie, wenn für den Logarithmus des Aktivitätskoeffizienten von NAD^{+2-} $\lg f_{NAD^+} = -1{,}3\sqrt{I}$, für den von $NADH^{2-}$ $\lg f_{NADH} = -2{,}0\sqrt{I}$ angenommen wurde. Neuere Untersuchungen am 2-Aminoäthanol-1-phosphat^{+2-} (11) lassen die Gleichung für $\lg f_{NAD^+}$ nicht berechtigt erscheinen. BURTON und WILSON übertrugen ihre Ergebnisse von der MDH- auf die GDH-Reaktion. Wie Tabelle 7 zeigt kommen wir zu anderen Resultaten.

In den Tabellen 8 und 9 haben wir unsere Messungen im Sinne der Gleichungen (7) und (11) ausgewertet. Der Berechnung der Grundreaktionsarbeit ist die thermodynamische Gleichgewichtskonstante bei der Ionenstärke 0 Mol/l und pH 7.0 zu Grunde gelegt. Sie ergibt sich aus den Gleichungen zu den Figuren 1 und 3, bei Figur 2 auch aus dem Ordinatenabschnitt. Für die Grundpotentiale α-GP/DAP und Lac/Pyr haben wir das NADH/NAD^+-Potential $E_{A/Q} = -323$ mV (nach RODKEY (38)) benutzt. Unsere in den Tabellen 8 und 9 aufgeführten Daten stimmen mit denen anderer Untersucher gut überein (Übersicht in (23)).

2.2 Relaxationskonstanten

2.21 Grundlagen

Enzymatische Vier-Partner-Reaktionen, zu denen GDH- und LDH-Reaktion zählen, können nach verschiedenen Reaktionsmechanismen verlaufen (Übersicht bei CLELAND (12)). Nach den Arbeiten von SCHWERT und seinen Mitarbeitern (17,42) ist für die LDH eine geordnete Anlagerung der Reaktionspartner an das Enzymprotein im Sinne eines Ordered Bi Bi-Mechanismus (12) wahrscheinlich. Für die GDH liegen analoge Untersuchungen nicht vor. Sicher ist, daß das GDH-Protein NAD und NADH binden kann. Wir wollen in dieser Arbeit daher vereinfachend GDH- und LDH-Reaktion als Ordered Bi Bi-Mechanismus behandeln:



A NADH) Substrate P α-GP bzw. Lac) Produkte
B DAP bzw. Pyr) Q NAD^+)

E GDH (EA), (EAB-EPQ), (EQ)) intermediäre Komplexe
F LDH (FA), (FAB-FPQ), (FQ)) von Enzym und Partnern

k_1, k_2, ... Reaktionskonstanten

Die Überlegungen von MICHAELIS und MENTEN (30) und BRIGGS und HALDANE (5,16) bilden die Grundlage für die rechnerische Behandlung einer enzymatischen Reaktion. Für den in Gleichung (27) skizzierten Ordered Bi Bi-Mechanismus der enzymatischen Vier-Partner-Reaktion ergibt sich die zeitliche Änderung der Partnerkonzentrationen nach folgender Gleichung (vgl. CLELAND (12)):

$$-\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = \frac{d[Q]}{dt} \qquad (28)$$

$$= \frac{(k_1k_3k_5k_7[A][B] - k_2k_4k_6k_8[P][Q])\,\Sigma E}{k_2(k_4 + k_5)k_7}$$

$$+k_1(k_4 + k_5)k_7[A] \qquad +k_2(k_4 + k_5)k_8[Q]$$
$$+k_3k_5k_7[B] \qquad +k_2k_4k_6[P]$$
$$+k_1k_3(k_5 + k_7)[A][B] \qquad +(k_2 + k_4)k_6k_8[P][Q]$$
$$+k_1k_4k_6[A][P] \qquad +k_1k_3k_6[A][B][P]$$
$$+k_3k_5k_8[B][Q] \qquad +k_3k_6k_8[B][P][Q]$$

Gleichung (28) läßt sich in Gleichung (29) überführen, in der die Reaktionskonstanten durch die kinetischen Konstanten ersetzt sind.

$$-\frac{d[A]}{dt} = \frac{V_1([A][B] - [P][Q]/K_c)}{K_{IA}K_B + K_B[A] + K_A[B] + [A][B] + \frac{K_A}{K_{IQ}}[B][Q]} \qquad (29)$$

$$+\frac{1}{K_{IP}}[A][B][P] + \frac{V_1}{V_2 K_c}(K_Q[P] + K_P[Q] + [P][Q]$$

$$+\frac{K_Q}{K_{IA}}[A][P] + \frac{1}{K_{IB}}[B][P][Q])$$

Definitionen zu Gleichung (29):

V_1 Maximalgeschwindigkeit der "Hinreaktion" (Substratkonzentrationen im Sättigungsbereich, Produktkonzentrationen = 0)

V_2 Maximalgeschwindigkeit der "Rückreaktion" (Produktkonzentrationen im Sättigungsbereich, Substratkonzentrationen = 0)

K_A, K_B, K_Q, K_P MICHAELIS-Konstanten von A, B, Q, P.

K_{IA}, K_{IB}, K_{IQ}, K_{IP} Konstanten für Substrat- bzw. Produkthemmung.

K_c Gleichgewichtskonstante (vgl. Gleichung (4)).

$[A]$, $[B]$, $[P]$, $[Q]$ beliebige Konzentrationen der Reaktionspartner

$[\bar{A}]$, $[\bar{B}]$, $[\bar{P}]$, $[\bar{Q}]$ Gleichgewichtskonzentrationen der Reaktionspartner

Die beliebigen Partnerkonzentrationen können durch die jeweiligen Gleichgewichtskonzentrationen und die zugehörigen Gleichgewichtsauslenkungen Δ ausgedrückt werden

$$[\bar{A}] + \Delta = [A], \quad [\bar{Q}] - \Delta = [Q], \qquad [\bar{B}] + \Delta = [B], \quad [\bar{P}] - \Delta = [P]. \tag{30}$$

Durch Substitution in Gleichung (29) und mit

$$-\frac{d[\bar{A}]}{dt} = 0 \text{ und } V_1([\bar{A}][\bar{B}] - [\bar{P}][\bar{Q}]/K_c) = 0 \tag{31}$$

erhält man eine Gleichung der Form

$$\frac{d\Delta}{dt} = -\Delta k_{ss} \tag{32}$$

Anders als bei der enzymatischen Zwei-Partner-Reaktion (18) ist k_{ss} hier eine kompliziertere Funktion von Δ.

$$k_{ss} = \frac{V_1\,([\bar{A}]+[\bar{B}]+\Delta + ([\bar{P}]+[\bar{Q}]-\Delta)/K_c)}{K_{IA}K_B + K_B[\bar{A}] + K_A[\bar{B}] + [\bar{A}][\bar{B}] + \frac{K_A}{K_{IQ}}[\bar{B}][\bar{Q}] + \frac{1}{K_{IP}}[\bar{A}][\bar{B}][\bar{P}]} \tag{33}$$

$$+\frac{V_1}{V_2K_c}\left(K_Q[\bar{P}] + K_P[\bar{Q}] + [\bar{P}][\bar{Q}] + \frac{K_Q}{K_{IA}}[\bar{A}][\bar{P}] + \frac{1}{K_{IB}}[\bar{B}][\bar{P}][\bar{Q}]\right)$$

$$+\Delta\left(K_B + K_A + [\bar{A}] + [\bar{B}] + \frac{K_A}{K_{IQ}}\{[\bar{Q}]-[\bar{B}]\} + \frac{1}{K_{IP}}\{[\bar{B}][\bar{P}] + [\bar{A}][\bar{P}] - [\bar{A}][\bar{B}]\}\right.$$

$$\left.-\frac{V_1}{V_2K_c}\left(K_Q + K_P + [\bar{P}] + [\bar{Q}] + \frac{K_Q}{K_{IA}}\{[\bar{A}]-[\bar{P}]\} + \frac{1}{K_{IB}}\{[\bar{B}][\bar{Q}] + [\bar{B}][\bar{P}] + [\bar{P}][\bar{Q}]\}\right)\right)$$

$$+\Delta^2\left(1 - \frac{K_A}{K_{IQ}} - \frac{1}{K_{IP}}\{[\bar{A}]+[\bar{B}]\} + \frac{V_1}{V_2K_c}\left(1 - \frac{K_Q}{K_{IA}} - \frac{1}{K_{IB}}\{[\bar{P}]+[\bar{Q}]\}\right)\right)$$

$$+\Delta^3\left(\frac{V_1}{V_2K_cK_{IB}} - \frac{1}{K_{IP}}\right)$$

Ist die Gleichgewichtsauslenkung Δ sehr klein gegen die Gleichgewichtskonzentrationen so vereinfacht sich die Gleichung (33) zu

$$k_{ss} = \frac{V_1\,([\bar{A}]+[\bar{B}]+\Delta+([\bar{P}]+[\bar{Q}]-\Delta)/K_c)}{K_{IA}K_B+K_B[\bar{A}]+K_A[\bar{B}]+[\bar{A}][\bar{B}]+\frac{K_A}{K_{IQ}}[\bar{B}][\bar{Q}]+\frac{1}{K_{IP}}[\bar{A}][\bar{B}][\bar{P}]} \quad (34)$$

$$+\frac{V_1}{V_2K_c}(K_Q[\bar{P}]+K_P[\bar{Q}]+[\bar{P}][\bar{Q}]+\frac{K_Q}{K_{IA}}[\bar{A}][\bar{P}]+\frac{1}{K_{IB}}[\bar{B}][\bar{P}][\bar{Q}])$$

Mit den in orientierenden Messungen gewonnenen Daten der Tabelle 10 und bei $[\bar{A}][\bar{B}] = 6{,}7\ (\mu Mol/l)^2$, $[\bar{P}] = 200{,}0\ \mu Mol/l$ und $[\bar{Q}] = 500{,}0\ \mu Mol/l$ findet man bei Gleichung (33)

$$k_{ss} = \frac{3800\,([\bar{A}]+[\bar{B}]+\Delta) + 179}{344\,[\bar{A}]+30[\bar{B}]+197+\Delta(0{,}07[\bar{A}]+0{,}65[\bar{B}]+373) - \Delta^2(0{,}003\{[\bar{A}]+[\bar{B}]\}+0{,}63) - \Delta^3\,0{,}003} \quad (35)$$

Wieder entsprechend findet man mit $[\bar{A}][\bar{B}] = 26{,}8\ (\mu Mol/l)^2$, $[\bar{P}] = 400{,}0\ \mu Mol/l$ und $[\bar{Q}] = 1000{,}0\ \mu Mol/l$

$$k_{ss} = \frac{3800\,([\bar{A}]+[\bar{B}]+\Delta) + 357}{702[\bar{A}]+58[\bar{B}]+455+\Delta(0{,}71[\bar{A}]+2{,}28[\bar{B}]+712) - \Delta^2(0{,}003\{[\bar{A}]+[\bar{B}]\}+0{,}63) - \Delta^3\,0{,}003} \quad (36)$$

und mit $[\bar{A}][\bar{B}] = 67\ (\mu Mol/l)^2$, $[\bar{P}] = 1000\ \mu Mol/l$ und $[\bar{Q}] = 1000\ \mu Mol/l$

$$k_{ss} = \frac{3800\,([\bar{A}]+[\bar{B}]+\Delta) + 509}{1570[\bar{A}]+58[\bar{B}]+1091+\Delta(2{,}63[\bar{A}]+4{,}11[\bar{B}]+1657) - \Delta^2(0{,}003\{[\bar{A}]+[\bar{B}]\}+0{,}63) - \Delta^3\,0{,}003} \quad (37)$$

Mit Werten für $[\bar{A}]$ und $[\bar{B}]$ findet sich für Δ nach 0 µMol/l bzw. 0 % von $[\bar{B}]$ der in Figur 4 dargestellte Zusammenhang zwischen $[\bar{B}]$ und k_{ss}/V_1, der auf die Enzymaktivität im Standardtest bezogenen Relaxationskonstanten. Die Figur zeigt, daß mit zunehmendem $[\bar{B}]$ die Relaxationskonstante wächst.

Werden aus den Gleichungen (35) bis (37) zu gegebenen Werten von $[\bar{A}]$ und $[\bar{B}]$ die Relaxationskonstanten für verschiedene Gleichgewichtsauslenkungen errechnet, so zeigt sich, daß mit zunehmender prozentualer Abweichung von den Gleichgewichtskonzentrationen k_{ss} abnimmt und schließlich einen Grenzwert erreicht (Figur 5). Für Δ über 50 % von $[\bar{B}]$ kann die Änderung der k_{ss}-Werte bei den berechneten Kurven vernachlässigt werden. In den Versuchen liegt diese Grenze schon bei 5 - 10 %. In den Rechnungen liegen große Variationen bei 0 - 10 %.

2.22 Relaxationsmessungen

Zur Bestimmung der Relaxationskonstanten registriert man, etwa unter den Bedingungen der Tabellen 11 und 12, die Kinetik der Gleichgewichtseinstellung und verfolgt dann die zeitliche Änderung der Gleichgewichtsauslenkung Δ über den ganzen Verlauf im Sinne der integrierten Gleichung (32)

$$- k_{ss}\, t = \int_{o}^{t} \frac{d\Delta}{\Delta} = \ln\Delta_t - \ln\Delta_o = \ln \frac{\Delta_t}{\Delta_o} \qquad (38)$$

$$\Delta_t = \Delta_o\, e^{-k_{ss}\, t} \qquad (39)$$

Nach Gleichung (39) läßt sich k_{ss} als $1/k_{ss}$ leicht bestimmen, wenn zu verschiedenen Zeiten t_o, t_1, ... t_n die zugehörigen Auslenkungen Δ_o, Δ_1, ... Δ_n aus der Registrierung entnommen und im semilogarithmischen Netz aufgetragen werden.

Ist k_{ss} für die verschiedenen Δ tatsächlich konstant, so ergibt sich bei dieser Art der Auftragung eine Gerade. In den Auswertungen unserer Relaxationsexperimente findet sich eine leichte Krümmung, deren Maximum in Figur 6 wiedergegeben wird. Wie diese Figur zeigt, ist eine solche nichtlineare Abhängigkeit für den vermuteten Reaktionsmechanismus durchaus zu erwarten.

Bei $t = 1/k_{ss}$ ist

$$\Delta_{1/k_{ss}} = \Delta_o\, e^{-1} \qquad (40)$$

Dividiert man Δ_o durch e, so erhält man $\Delta_{1/k_{ss}}$ und kann der Auftragung das entsprechende t (= $1/k_{ss}$) entnehmen.

Die Versuche der Tabellen 11 und 12 nähern sich in ihren Modellbedingungen unterschiedlich weit dem Zellmilieu. In Nr. 5 und 9 der Tabelle 11 sind für die Reaktionspartner Konzentrationen gewählt, die in Größe und Proportion den Metabolitgehalten des Kaninchenmuskels ähneln (vgl. Tabelle 13). Die Versuche der Tabellen 11 b) und 12 b) enthalten zusätzlich als NADH-bindendes Protein stöchiometrische Mengen vom Malat-Dehydrogenase. Damit soll die Fähigkeit der Zelle nachgeahmt werden, NADH-Konzentrationen durch Bindung oder über eine Kopplung mit anderen NADH-NAD^+-abhängigen Oxydoreduktasen zu stabilisieren.

Die Dissoziationskonstante des MDH-NADH-Komplexes wurde durch fluorimetrische Titration von MDH aus Kaninchenmuskel mit NADH in Anwesenheit von NAD^+, DAP und α-GP in den Konzentrationen der Tabelle 11 b) und in demselben Milieu zu 3 µMol/l bestimmt.

$$K_{MDH\text{-}NADH} = \frac{[\overline{NADH}]\,[\overline{MDH}]}{[\overline{MDH\text{-}NADH}]} = 3\ \mu Mol/l \qquad (41)$$

Bei einem Molekulargewicht von etwa 40000 bindet ein Molekül MDH ein Molekül NADH.

In den Versuchen mit MDH konkurrieren die GDH- bzw. die LDH-Reaktion mit

$$NADH + MDH \rightleftharpoons MDH\text{-}NADH \qquad (42)$$

um das Kosubstrat NADH. Die Gleichgewichtslage der NADH-bindenden Reaktion ist durch Gleichung (41) gegeben. Auch im Falle dieser Reaktion lassen sich die beliebigen Partnerkonzentrationen durch die jeweiligen Gleichgewichtskonzentrationen und die Gleichgewichtsauslenkungen δ ausdrücken, so daß

$$\frac{d\delta}{dt} = -\delta\varkappa \text{ und } \delta_t = \delta_o\, e^{-\varkappa t} \qquad (43)$$

Die GDH- bzw. die LDH-Reaktionen Nr. 11 und 12 Tabelle 11 und Nr. 5 Tabelle 12 befinden sich zur Zeit der Zugabe von MDH im Gleichgewicht. NADH wird nun an das MDH-Protein gebunden; damit

erniedrigt sich die Konzentration des freien NADH, deren Größe die Gleichgewichtslage der GDH- und der LDH-Reaktion in diesem System festlegt. In diesen beiden Reaktionen wird nun ein Bruchteil von σ als Δ im Sinne der Gleichung (32) wirksam, d.h. es wird aus beiden Reaktionen, der GDH- bzw. der LDH-Reaktion, freies NADH nachgeliefert bis zu einem neuen Gleichgewicht, in dem

$$K_{MDH\text{-}NADH} \frac{[\overline{MDH\text{-}NADH}]}{[\overline{MDH}]} = \frac{[\bar{P}]\,[\bar{Q}]}{K_c\,[\bar{B}]} \qquad (44)$$

Die exakte rechnerische Behandlung dieses komplexen Systems kann hier nicht vorgelegt werden. Vermutlich bestimmt, je nach der Richtung der Reaktion erst nach einer Übergangsphase, der langsamste Schritt den Durchsatz in der ganzen zweigliederigen Kette. Wird die zeitliche Änderung von NADH bis in das neue Gleichgewicht registriert und in der bereits dargelegten Weise die Relaxationskonstante ermittelt, so zeigt sich, daß in der Gegenwart von MDH k_{ss} nur 1/5 bis 1/7 seines Wertes ohne dieses Protein hat. Einiges spricht dafür, daß das in diesen Versuchen gemessene k_{ss} mit $\varkappa$ identisch ist.

In den Tabellen 11 und 12 sind die Relaxationskonstanten auf die Enzymaktivität des Standardtestes bezogen. Dies hat sich für die Anwendung in 2.3 als zweckmäßig erwiesen.

Wir haben schon darauf hingewiesen, daß die Auswertung der Relaxationsmessungen im semilogarithmischen Netz deutliche Krümmungen zeigt. Entsprechend ist k_{ss} bei Δ von 0 % von $[\bar{E}]$ in unseren Messungen bis zu 1,5-fach größer als bei Δ von 100 %. Die Versuche mit MDH sind hier nicht berücksichtigt. Wie die Tabellen 11 b) und 12 b) demonstrieren sind die Variationen hier erheblich größer. Trotz dieser Inkonstanz von k_{ss} läßt sich die Relaxationskonstante wenigstens für näherungsweise Resultate und Rechnungen in der Zellphysiologie benutzen.

2.3 Ungleichgewichte und Flußraten im Kaninchenmuskel

Die Einzelreaktionen der Glykolyse in der Zelle lassen sich zwei Gruppen zuweisen (9):

1) Reaktionen mit erheblichem Ungleichgewicht und großer Arbeitsfähigkeit (Fallstrecken im Modell des regulierten Wasserlaufs),
2) Reaktionen mit angenähertem Gleichgewicht, die eine verlustarme Aufbereitung und Leitung des Stoffstromes besorgen (Staustrecken).

In solchen Staustrecken liegen GDH- und LDH-Reaktion. Eine in der Staustrecke der Stoffwechselkette befindliche Teilreaktion (katalysierendes Prinzip, Reaktionspartner, aktivierende Ionen) werde - im Gedankenexperiment - von der fließenden Kette getrennt. Diese isolierte Reaktion würde sich unmittelbar in den Gleichgewichtszustand begeben. Die Anfangsgeschwindigkeit $d\Delta_o/dt$ dieser Gleichung (32) folgenden Relaxation entspräche der unter diesen Bedingungen am Ort der Teilreaktion möglichen Stromstärke V_{st}. Mit der stationären Gleichgewichtsauslenkung Δ_{st} und der Relaxationskonstanten $(k_{ss})_{Gewebe}$ des Gewebsenzyms erhält man aus Gleichung (32)

$$V_{st} = \Delta_{st} (k_{ss})_{Gewebe} \qquad (45)$$

Die Relaxationskonstante des Gewebsenzyms errechnet man aus dem k_{ss} des Modells. Nach Gleichung (33) bzw. (34) ist k_{ss} über einen von der im Versuch eingesetzten Enzymmenge unabhängigen Faktor eben dieser durch V_1 ausgedrückten Menge direkt proportional. Für ein gegebenes Modell mit verschiedenen Enzymmengen ist

$$\left(\frac{k_{ss}}{V_1}\right)_1 = \left(\frac{k_{ss}}{V_1}\right)_2 = \text{konstant} \qquad (46)$$

Für $(k_{ss})_{Gewebe}$ ergibt sich mit dem im Standardtest bei der Temperatur des Relaxationsexperimentes ermittelten oder dafür umgerechneten Enzymaktivitätsgehalt des Gewebes $(V_1)_{Gewebe}$ (Tabelle 14), dem unter denselben Bedingungen bestimmten $(V_1)_{Exp.}$ des Rekonstruktionsversuches und seiner zugehörigen $(k_{ss})_{Exp.}$ (vgl. Tabellen 11 und 12)

$$(k_{ss})_{Gewebe} = \left(\frac{k_{ss}}{V_1}\right)_{Exp.} (V_1)_{Gewebe} \qquad (47)$$

Diese Gleichung (47) hat zur Voraussetzung, daß sich die Enzymmoleküle im Zellmilieu und in gegenüber den Relaxationsversuchen um drei bis vier Zehnerpotenzen höherer Konzentration ebenso wie in vitro verhalten und gleiche Wirkungen entfalten.

Genaugenommen bezeichnet das Symbol V_1 eine kinetische Konstante der MICHAELIS-Theorie (vgl. Gleichung (29)). Zwischen der Enzymaktivität im Standardtest und dieser kinetischen Konstanten besteht die Relation

$$(V_1)_{MICHAELIS} = (V_1)_{Exp.} \cdot \text{konstant} \qquad (48)$$

In dieser Arbeit lassen sich die verschiedenen Symbole leicht und eindeutig aus dem jeweiligen Zusammenhang unterscheiden.

Die stationäre Gleichgewichtsauslenkung Δ_{st} ergibt sich aus den stationären Metabolitkonzentrationen in der Zelle. Diese zellulären Konzentrationen der Zwischenstoffe sind nicht bekannt. An ihre Stelle können mit nicht völlig zulässiger Vereinfachung die Metabolitgehalte treten. Es ist dann

$$\begin{aligned} \{A\} &= \{\bar{A}\} + \Delta_{st}, & \{Q\} &= \{\bar{Q}\} - \Delta_{st}, \\ \{B\} &= \{\bar{B}\} + \Delta_{st}, & \{P\} &= \{\bar{P}\} - \Delta_{st}. \end{aligned} \qquad (49)$$

An anderer Stelle (9) bedienten wir uns zur Abschätzung der Proportion $V_{st}/(V_l)_{Gewebe}$ folgender Formulierungen: Mit

$$\Gamma = \frac{\{P\}\ \{Q\}}{\{A\}\ \{B\}} \tag{50}$$

ist

$$\Delta_{st} = \{\bar{B}\}\ (\frac{K_c}{\Gamma} - 1), \tag{51}$$

wenn

$$\{\bar{A}\} = \text{konst. und } \frac{\Delta_{st}}{\{\bar{P}\}} \text{ sowie } \frac{\Delta_{st}}{\{\bar{Q}\}} \ll 1 \tag{52}$$

Einsetzen in Gleichung (45) führt hier zu

$$\frac{V_{st}}{(V_l)_{Gewebe}} = (\frac{k_{ss}}{V_l})_{Exp.}\ \{\bar{B}\}\ (\frac{K_c}{\Gamma} - 1) \tag{53}$$

Anders als bei der Leber der weißen Ratte ist beim Skelettmuskel des Hauskaninchens der zweite Teil von Gleichung (52) nicht erfüllt. Im Zustand tetanischer Kontraktion sind die Ungleichgewichte im Muskel erheblich. $\{\bar{B}\}$ läßt sich also nicht mit geringen Änderungen den analytischen Daten zu den Metabolitgehalten entnehmen.

Das Ausmaß des stationären Ungleichgewichtes in der Muskelzelle wird deutlich, wenn man den Quotient $(\{\alpha\text{-GP}\}\{Pyr\})/(\{DAP\}\{Lac\})$ mit dem mittleren pH-unabhängigen Quotienten der Gleichgewichtskonstanten der LDH- und der GDH-Reaktion vergleicht. Im Bereich für den Kaninchenmuskel physiologischer Kaliumkonzentrationen (130 - 150 mMol/l, (26)) liegt dieser Quotient (K_I/K_G) in KH_2PO_4-K_2HPO_4-Puffern der Ionenstärke 0,200 Mol/l (vgl. Tabellen 1 und 2 sowie Figur 1) bei 0,68 (Kaliumionen ca. 137 mMol/l). In einem Imidazol-Puffer der Ionenstärke 0,224 Mol/l mit K_2SO_4 (Tabelle 5, Nr. 12 und Tabelle 6, Nr. 25; Kaliumionen 134 mMol/l) findet sich analog eine Proportion 0,58. Die Ionenstärken dieser Puffer sind von der Ionenstärke des Blutserums nicht allzu weit entfernt (I 0,170 Mol/l) (34). Diese beiden Werte für K_I/K_G liegen nahe bei dem Quotienten $(\{\alpha\text{-GP}\}\{Pyr\})/(\{DAP\}\{Lac\})$ des Ruhestatus des roten wie des weißen Kaninchenmuskels (vgl. Tabelle 13). Ein K_{cG}/K_{cL} von 0,68 stimmt mit dem Quotienten der mittleren Metabolitproportionen des weißen Muskels überein.

Die Werte der Quotienten ({α-GP}{Pyr})/({DAP}{Lac} 0,68) nach 10, 20 und 30 Sekunden tetanischer Kontraktion zeigen sowohl beim roten als auch beim weißen Muskel erhebliche Ungleichgewichte an (vgl. Tabelle 15).

Ist die stationäre Gleichgewichtsauslenkung Δ_{st} bekannt, so läßt sich die Proportion $V_{st}/(V_l)_{Gewebe}$ einfach nach

$$\frac{V_{st}}{(V_l)_{Gewebe}} = \left(\frac{k_{ss}}{V_l}\right)_{Exp.} \Delta_{st} \qquad (54)$$

berechnen. SCHIMASSEK, KADENBACH, RÜSSMANN und BÜCHER (39) haben eine Beziehung angegeben, die eine Abschätzung von Δ_{st} wenigstens bei der GDH-Reaktion aus den vorliegenden Daten gestattet, wenn das Lac/Pyr-System als Indikator des Oxydations-Reduktionsgrades des NAD⁺/NADH-Systems benutzt werden kann. Dies ist möglich, wenn das Ungleichgewicht in der LDH-Reaktion gering ist und die LDH- wie die GDH-Katalyse in demselben zellulären Lösungsraum ablaufen. Beide Bedingungen sind bei der Leber weitgehend erfüllt. HOHORST (20) hat für den Bauchmuskel der Ratte eine weitgehend voneinander unabhängige Beweglichkeit der α-GP/DAP- und der Lac/Pyr-Quotienten bei tetanischer Kontraktion gefunden. Daneben hat er auf eine mit dem Tetanus einsetzende α-GP-Pyr-Dismutation hingewiesen und aus diesen beiden Befunden eine funktionelle Kompartimentierung des Zytoplasmas erschlossen. Die weitgehende Unabhängigkeit der Metabolitbewegungen im roten und weißen Muskel des Kaninchens legt eine analoge Annahme nahe. Berechnet man trotz dieses Einwandes gegen einen einheitlichen zytoplasmatischen Lösungsraum des Muskels die stationäre Gleichgewichtsauslenkung für die GDH-Reaktion nach

$$\Delta_{st} = \{DAP\} \frac{1 - \dfrac{aH^+ \, K_{cL} \, \{\alpha\text{-GP}\} \{Pyr\}}{K_{cG} \, aH^+ \, \{DAP\} \{Lac\}}}{1 - \dfrac{aH^+ \, K_{cL} \, \{Pyr\}}{K_{cG} \, aH^+ \, \{Lac\}}}, \qquad (55)$$

so ergeben sich die in Tabelle 15 aufgeführten Werte. Für den weißen Muskel findet man nach 20 und 30 Sekunden Tetanus negative Δ_{st}. In unserer Ableitung (Gleichung (54)) bedeutet das eine Umkehrung der mit Gleichung (27) vorausgesetzten Stromrichtung DAP⟶α-GP. Wir wollen im folgenden bei beiden Muskeln deshalb nur auf die Kontrollwerte (Ruhezustand) und die Metabolitgehalte nach 10 Sekunden tetanischer Aktivität eingehen.

Tabelle 15 enthält Angaben für die Gleichgewichtsgehalte von DAP ($\{\bar{B}\}$). Passende $(k_{ss}/V_l)_{Exp.}$ können dem Versuch Nr. 9 der Tabelle 11 oder der Figur 4 (+) entnommen werden. Dieser Versuch (nr. 9) approximiert Ionenstärke, pH, Kaliumkonzentration, DAP- und α-GP-Gehalte des roten Muskels. Die verwerteten $(k_{ss}/V_l)_{Exp.}$ sind in Tabelle 15 aufgeführt. Mit Gleichung (54) erzielt man Proportionen $V_{st}/(V_l)_{Gewebe}$, die mit den aus den analytischen Daten KRIEGs und PETTEs ermittelten recht gut übereinstimmen (vgl. Tabellen 14 und 15). In Figur 7 ist dieses Resultat verdeutlicht und um ein Ergebnis aus den Modellversuchen mit MDH erweitert.

Damit haben wir auf verschiedenen Wegen in V_{st}/V_l die zelluläre Stromstärke bei der GDH-Reaktion im roten Muskel ermittelt. Die eine Methode geht von dem Glycerophosphat-Zuwachs nach tetanischer Aktivität aus. Das andere Verfahren führt einen Korrekturfaktor für den auf 37° C umgerechneten Enzymaktivitätsgehalt ein (vgl. Gleichung (54)). Diese Korrektur vereinigt alle experimentellen und analytischen Informationen: Zur Berechnung

von Δ_{st} gehören Metabolitgehalte und Gleichgewichtskonstanten. Modellversuche in vitro liefern k_{ss}. Danach scheinen Metabolitgehalte und stationäre Ungleichgewichte wesentlich von den bekannten Enzymaktivitätsgehalten bestimmt, diese Gehalte aber ihrerseits in ihrer zellulären Leistung durch jene modifiziert. Die Annahme einer Kompartimentierung des zellulären Lösungsraumes wäre in diesem System nicht erforderlich. Die Eigenschaften der Enzymproteine und ihr kinetisches Verhalten würden die Relation der Metabolitproportionen teilweise erklären.

Diese Arbeit rechnet hier mit den Gehalten wie mit thermodynamischen Aktivitäten. Das ist meist möglich, da in alle Rechnungen Verhältniszahlen eingehen. Eine wesentliche Ausnahme macht der wiedergegebene Weg zu Δ_{st}. Liegen die Metabolitgehalte um die Hälfte unter den Aktivitäten, so verdoppelt sich die stationäre Gleichgewichtsauslenkung. Bei dem zu Grunde gelegten Vier-Partner-Mechanismus (Ordered Bi Bi) führt eine Verdopplung der Partnerkonzentrationen zu einer Halbierung der Relaxatiosnkonstanten (vgl. Figur 4, Kurve 2 gegen 1). Das Endergebnis bliebe unverändert.

Für den weißen Muskel sind entsprechende Resultate schwerer verständlich. Im Ruhezustand ist nach Tabelle 15 der Durchsatz bei der GDH-Reaktion 0. Nach 10 Sekunden tetanischer Kontraktion erreicht die Proportion von Flußrate zu Aktivitätsgehalt einen auffallend hohen Wert. Mit den $(k_{ss}/V_1)_{Exp.}$ der Figur 4 (+) liegt er über 2. Werden, wie in Tabelle 15 geschehen, Korrekturen für die Größe der Metabolitgehalte vorgenommen (vgl. oben), so erreicht man eine bessere, aber immer noch relativ ungünstige Anpassung. Hier sind weitere Modellversuche notwendig.

Analoge Rechnungen für die LDH sind wegen fehlenden analytischen Materials noch nicht möglich.

3. Tabellen und Figuren

Tabelle 1 Gleichgewichtskonstanten der GDH-Reaktion in KH_2PO_4-K_2HPO_4-Puffern bei 37° C.

Nr.	I Mol/l	pH	$[K^+]$ mMol/l	$aH^+/K_{c\,G}$ Mol/l x 10^{12}
1	0,05	6.86	36,9	9,48
2	0,05	6.73	36,9	10,75
3	0,05	7.23	35,7	9,56
4	0,05	7.24	35,7	10,71
5	0,05	7.11	35,7	13,95
6	0,10	6.88	73,9	8,47
7	0,10	6.88	73,9	9,67
8	0,10	6.89	73,9	10,83
9	0,10	7.16	70,2	9,98
10	0,10	7.22	70,2	10,90
11	0,10	7.17	70,2	11,30
12	0,10	7.15	70,2	11,39
13	0,10	7.27	70,2	11,45
14	0,10	7.21	70,2	11,58
15	0,10	7.20	70,2	11,93
16	0,20	6.88	147,7	10,20
17	0,20	6.88	147,7	10,36
18	0,20	6.89	147,7	10,75
19	0,20	6.87	147,7	10,98
20	0,20	6.89	147,7	11,00
21	0,20	6.89	147,7	11,00
22	0,20	6.89	147,7	11,46
23	0,20	6.88	147,7	11,60
24	0,20	6.89	147,7	11,65
25	0,20	6.89	147,7	11,70
26	0,20	6.88	147,7	11,81
27	0,20	6.90	147,7	11,87
28	0,20	6.81	147,7	11,92
29	0,20	6.88	147,7	12,13
30	0,20	6.81	147,7	12,17
31	0,20	6.81	147,7	12,33
32	0,20	6.81	147,7	12,63
33	0,20	6.88	147,7	12,80
34	0,20	7.21	147,7	10,20
35	0,20	7.21	139,1	11,85
36	0,20	7.21	139,1	12,20
37	0,20	7.22	139,1	12,27
38	0,20	7.20	139,1	12,70
39	0,20	7.20	139,1	12,75
40	0,20	7.23	139,1	12,75
41	0,20	7.47	139,1	12,20
42	0,20	7.47	139,1	13,40
43	0,20	7.37	139,1	13,86
44	0,20	7.40	139,1	15,03

Tabelle 2 Gleichgewichtskonstanten der LDH-Reaktion in KH_2PO_4-K_2HPO_4-Puffern bei 37° C.

Nr.	I Mol/l	pH	[K⁺] mMol/l	$aH^+/K_{c\ L}$ Mol/l x 10^{12}
1	0,05	6.68	36,9	9,51
2	0,05	7.07	35,7	9,50
3	0,05	7.08	35,7	9,50
4	0,05	7.05	35,7	9,78
5	0,10	6.84	73,9	9,22
6	0,10	7.20	70,2	8,39
7	0,20	6.90	147,7	7,34
8	0,20	6.89	147,7	7,90
9	0,20	6.90	147,7	8,35
10	0,20	6.89	147,7	8,42
11	0,20	6.89	147,7	8,46
12	0,20	6.90	147,7	8,35
13	0,20	7.21	147,7	7,71

Tabelle 3 Gleichgewichtskonstanten der GDH-Reaktion in Imidazol-Puffern bei 37° C.

Nr.	Imidazol mMol/l	I Mol/l	pH	$aH^+/K_{c\ G}$ Mol/l x 10^{12}
1	12,5	0,0024	7.15	14,24
2	12,5	0,0058	6.60	13,64
3	50,0	0,0232	6.70	16,30

Tabelle 4 Gleichgewichtskonstanten der LDH-Reaktion in Imidazol-Puffern bei 37° C.

Nr.	Imidazol mMol/l	I Mol/l	pH	$aH^+/K_{c\ L}$ Mol/l x 10^{12}
1	12,5	0,0024	6.91	12,24
2	12,5	0,0058	6.39	11,90
3	50,0	0,0232	6.62	12,70

Tabelle 5 Gleichgewichtskonstanten der GDH-Reaktion in 50 mMol/l Imidazol-Puffern mit verschiedenen Salzen bei 37° C.

Nr.	Salz	mMol/l	I Mol/l	pH	$aH^+/K_{c\,G}$ Mol/l x 10^{12}
1	KCl	100	0,105	7.45	18,90
2	KCl	100	0,105	7.45	19,20
3	KCl	100	0,113	7.05	19,75
4	KCl	100	0,113	7.00	22,80
5	KCl	100	0,122	6.69	19,39
6	KCl	100	0,132	6.22	20,09
7	KCl	200	0,218	6.78	21,30
8	NaCl	100	0,122	6.69	23,50
9	NaCl	100	0,122	6.62	24,20
10	NaCl	100	0,122	6.62	25,35
11	K_2SO_4	33	0,125	6.68	16,79
12	K_2SO_4	67	0,224	6.69	14,39
13	$MgSO_4$	25	0,122	6.69	24,15
14	$MgCl_2$	33	0,126	6.68	37,40

Tabelle 6 Gleichgewichtskonstanten der LDH-Reaktion in 50 mMol/l Imidazol-Puffern mit verschiedenen Salzen bei 37° C.

Nr.	Salz	mMol/l	I Mol/l	pH	$aH^+/K_{c\,L}$ Mol/l x 10^{12}
1	KCl	100	0,105	7.43	11,90
2	KCl	100	0,113	7.04	11,40
3	KCl	100	0,113	7.04	11,40
4	KCl	100	0,113	7.08	12,65
5	KCl	100	0,113	7.09	12,65
6	KCl	100	0,113	7.09	12,65
7	KCl	100	0,113	7.04	12,45
8	KCl	100	0,113	7.04	12,45
9	KCl	100	0,113	7.04	12,70
10	KCl	100	0,113	7.04	12,90
11	KCl	100	0,113	7.04	13,05
12	KCl	100	0,113	7.03	13,35
13	KCl	100	0,113	7.04	13,50
14	KCl	100	0,122	6.68	12,70
15	KCl	100	0,122	6.68	12,80
16	KCl	100	0,122	6.68	12,80
17	KCl	100	0,122	6.67	13,10
18	KCl	100	0,122	6.67	13,10
19	KCl	100	0,132	6.16	14,10
20	KCl	100	0,132	6.16	16,05
21	KCl	200	0,218	6.73	15,95
22	NaCl	100	0,122	6.59	16,20
23	NaCl	100	0,122	6.59	16,70
24	K_2SO_4	33	0,125	6.64	11,45
25	K_2SO_4	67	0,224	6.66	8,43
26	$MgSO_4$	25	0,122	6.65	15,85
27	$MgCl_2$	33	0,126	6.65	23,30

Tabelle 7 Werte für $(z_A^2 - z_Q^2)\varphi$ aus Figur 1, 2 und 3.

	GDH	LDH
Phosphat-Puffer	0,81	- 0,62
Imidazol-Puffer	1,18	0,34
Imidazol-Puffer mit KCl	1,05	3,08

Tabelle 8 Grundreaktionsarbeit und Gleichgewichtskonstante bei I 0 Mol/l, pH 7.C und 37° C bzw. 310° K.

	GDH		LDH	
	K_a 10^4	ΔG kcal	K_a 10^4	ΔG kcal
Phosphat-Puffer	1,35	5,9	0,84	5,6
Imidazol-Puffer	0,84	5,6	0,87	5,6
Imidazol-Puffer mit KCl	0,87	5,6	2,70	6,3

Tabelle 9 Grundpotentiale α-GP/DAP und Lac/Pyr bei 37° C bzw. 310° K und pH 7.0

Puffer	I Mol/l	Salz	mMol/l	$-E_{\alpha\text{-GP/DAP}}$ mV	$-E_{\text{Lac/Pyr}}$ mV
Phosphat	0,05	-	-	200	199
	0,10	-	-	201	198
	0,20	-	-	203	198
Imidazol	0,125	K_2SO_4	33	207	202
	0,224	K_2SO_4	67	205	198

Tabelle 10 Kinetische Konstanten der GDH, orientierende Messungen

Messung nach FLORINI und VESTLING (14).
50 mMol/l Triäthanolamin-Puffer, 5 mMol/l EDTA, 25° C, pH 7.5

V_1	3800	µMol/l/h	
V_2	800	µMol/l/h	
K_A	2	µMol/l	
K_B	30	µMol/l	
K_P	530	µMol/l	
K_Q	980	µMol/l	$K_{c\ G}$ 15000

Fluorimetrische Titration (6)
KH_2PO_4-K_2HPO_4-Puffer, I 0,06 Mol/l, 0,7 mMol/l EDTA, 25° C, pH 7.2

K_{IA}	0,2	µMol/l
K_{IQ}	36	µMol/l

Geschätzt nach den orientierenden Messungen

K_{IB}	230	µMol/l
K_{IP}	310	µMol/l

Tabelle 11 Relaxationskonstanten der GDH in KH_2PO_4-K_2HPO_4-Puffern

a) bei 37° C.

Nr.	I Mol/l	pH	$[\overline{NADH}]$ µMol/l	$[\overline{DAP}]$ µMol/l	$[\overline{\alpha\text{-GP}}]$ µMol/l	$[\overline{NAD^+}]$ µMol/l	Δ_o %	$(k_{ss}/V_1)_{E_1 xp.}$ (mMol/l)$^{-1}$
1	0,05	7.23	12,32	12,32	949,7	984,7	20	3,15
			13,52	11,29	950,7	985,7	2	3,52
2	0,05	7.24	13,28	13,28	950,7	985,7	20	3,21
			14,60	12,27	951,7	986,7	2	4,03
3	0,10	7.15	12,61	12,61	989,4	980,4	20	1,91
			14,01	11,65	990,4	981,4	2	2,42
4	0,10	7.16	3,90	3,90	210,1	505,1	20	2,36
			5,25	2,89	211,1	506,1	2	2,44
5	0,10	7.17	0,53	33,53	212,5	507,5	1	17,50
			0,64	28,72	217,3	512,3	2	13,20
			0,71	26,50	219,5	514,5	2	11,70
			0,80	23,94	222,1	517,1	2	10,00
			0,91	20,90	225,1	520,1	2	8,60
			1,04	18,44	227,6	522,6	2	7,25
6	0,20	6.88	8,84	8,84	996,0	996,0	20	2,03
			10,11	7,61	997,2	997,2	2	2,17
7	0,20	6.88	8,78	8,78	996,0	996,0	20	2,03
			9,04	7,52	997,3	997,3	2	2,17
8	0,20	6.88	0,99	9,17	196,0	504,0	2	11,70
			1,11	8.06	197,1	505,1	2	8,49
9	0,20	6.88	0,26	34,76	198,7	506,7	0,2	34,80
			0,28	33,28	200,2	508,2	1	29,40
			0,26	30,78	202,7	510,7	1	25,40
			0,28	28,30	205,0	513,0	1	18,30
			0,30	25,82	207,5	515,5	1	23,40
			0,33	23,35	210,0	518,0	1	21,00
			0,45	21,00	212,4	520,4	1	16,80
			0,51	18,53	214,8	522,8	2	15,00
			0,57	16,09	217,2	525,2	2	13,60
			0,65	13,67	219,6	527,6	2	11,70
			0,94	8,96	224,4	532,4	3	10,50
10	0,20	6.88	0,86	0,86	85,8	89,1	20	3,41
			2,56	0,27	86,8	89,7	100	2,69

Tabelle 11 Fortsetzung

b) bei 25° C mit MDH (Nr. 11 0,7, Nr. 12 1,0 mMol/l EDTA).

Nr.	I Mol/l	pH	[MDH] µMol/l	ΣNADH µMol/l	$[\overline{NADH}]$ µMol/l	$[\overline{DAP}]$ µMol/l	$[\overline{\alpha\text{-GP}}]$ µMol/l	$[\overline{NAD^+}]$ µMol/l	Δ_o %	(k_{ss}/V_1) Exp $(mMol/l)^{-1}$
11	0,06	7.24	-	0,5	0,5	63	359	962	-	-
			26	2,6	0,6	61	324	896	0,5	9,01
			26	2,0	0,5	88	321	886	0,5	8,37
12	0,045	7.18	-	1,2	1,2	42	410	1209	0,1	21,10
									0,5	16,30
									2,0	16,50
			28	4,76	1,01	44	383	1137	0,5	2,38
									5,0	2,37
			28	4,11	0,76	53	384	1138	0,1	6,89
									0,5	4,95
									1,0	2,37

Tabelle 12 Relaxationskonstanten der LDH in KH_2PO_4-K_2HPO_4-Puffern

a) bei 37° C

Nr.	I Mol/l	pH	$[\overline{NADH}]$ µMol/l	$[\overline{Pyr}]$ µMol/l	$[\overline{Lac}]$ µMol/l	$[\overline{NAD^+}]$ µMol/l	Δ_o %	(k_{ss}/V_1) Exp. $(mMol/l)^{-1}$
1	0,05	7.05	10,50	10,50	1043,5	960,5	20	6,25
			11,82	9,37	1044,6	961,6	2	8,26
2	0,10	7.20	11,90	11,90	1042,1	959,1	20	6,51
			13,18	10,71	1043,3	960,3	2	7,20
3	0,20	6.90	8,21	8,21	1044,8	960,3	20	7,84
			9,35	7,15	1045,9	961,4	2	8,79
4	0,20	6.90	9,07	9,07	466,9	2960,9	20	6,02
			10,08	7,95	468,1	2962,1	2	6,91

b) bei 25° C mit MDH (1,0 mMol/l EDTA)

Nr.	I Mol/l	pH	[MDH] µMol/l	ΣNADH µMol/l	$[\overline{NADH}]$ µMol/l	$[\overline{Pyr}]$ µMol/l	$[\overline{Lac}]$ µMol/l	$[\overline{NAD^+}]$ µMol/l	Δ_o %	(k_{ss}/V_1) Exp. $(mMol/l)^{-1}$
5	0,06	7.20	-	0,51	0,51	414	4000	957	-	-
			97	5,0		353	3361	800	0,1	10,5
									0,5	6,7
			97	4,0		443	3362	801	0,1	4,4

In den Tabellen 11 und 12 ist Δ_o in % von $[\overline{DAP}]$ und $[\overline{Pyr}]$ ausgedrückt.

Tabelle 13 Metabolitgehalte des roten und weißen Kaninchenmuskels (28).
Metabolite in nMol/$g_{Frischgewicht}$

Muskel	Reizdauer sec.	{Lac}	{Pyr}	$\frac{\{Lac\}}{\{Pyr\}}$	{α-GP}	{DAP}	$\frac{\{\alpha\text{-GP}\}}{\{DAP\}}$	$\frac{\{\alpha\text{-GP}\}\{Pyr\}}{\{DAP\}\{Lac\}}$
M. semitendinosus (rot)	0	4900	148	33	280	17	16	0,49
	10	6100	73	83	510	73	7,7	0,09
	20	5800	42	139	1370	280	5	0,04
	30	7500	115	65	390	87	4,4	0,07
M. adductor magnus (weiß)	0	9700	540	17,9	981	81	12,1	0,68
	10	18700	780	24	1200	126	9	0,38
	20	21700	930	24	1480	70	23	0,96
	30	27700	1160	24	1670	37	45	1,87

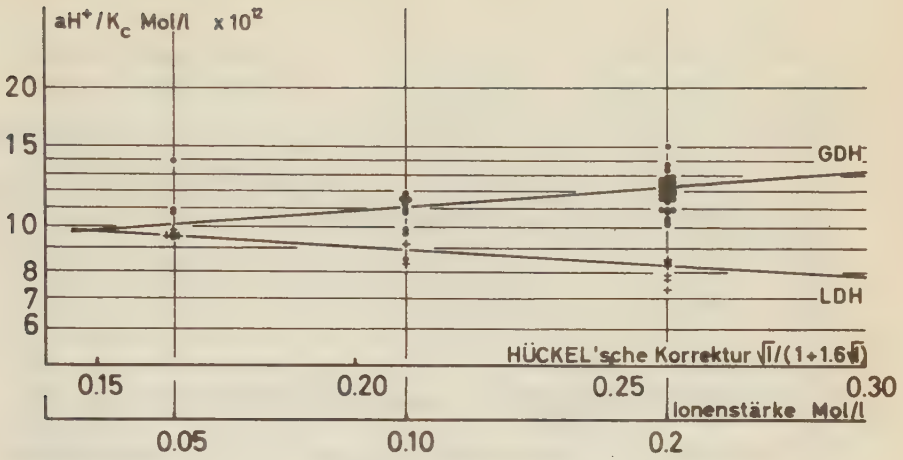
Tabelle 14 Enzymaktivitätsgehalte des roten und weißen Kaninchenmuskels (33,36) umgerechnet für 37° C und mittlere Flußraten in situ errechnet aus dem Lactat- und Glycerophosphat-Zuwachs nach tetanischer Kontraktion (28).
Enzymaktivitätsgehalte V_l µMol/$g_{Frischgewicht}$/h
mittlere Flußraten V_{st} µMol/$g_{Frischgewicht}$/h

Muskel	LDH V_l L	LDH V_{st} L	$\frac{V_{st}\ L}{V_l\ L}$	GDH V_l G	GDH V_{st} G	$\frac{V_{st}\ G}{V_l\ G}$
M. semitendinosus (rot)	14000	300	0,021	630	140	0,222
M. adductor magnus (weiß)	154000	2300	0,015	8400	105	0,013

Tabelle 15 Zelluläre GDH-Reaktion

Muskel	Reizdauer sec.	Γ/K_c G a)	Δ_{st} b)	$\{\overline{DAP}\}$ b)	$(k_{ss}/V_l)_{Exp.}$ c)	V_{st} G/V_l G d)	e)
M. semitendinosus (rot)	0	0,72	0,005	0,012	10	0,05	
	10	0,13	0,065	0,008	8	0,52	0,222
	20	0,06	0,266	0,014			
	30	0,10	0,080	0,007			
M. adductor magnus (weiß)	0	1,00	0,000	0,081		0	
	10	0,56	0,058	0,068	10 f)	0,58	0,013
	20	1,41	-0,031	0,101			
	30	2,74	-0,069	0,106			

a) entspricht ({α-GP}{Pyr})/({DAP}{Lac} 0,68)
b) mMol/kg, entspreche mMol/l
c) l/mMol, Werte aus Figur (KH_2PO_4-K_2HPO_4-Puffer, I 0,2 Mol/l, pH 6.88.
d) errechnet nach Gleichung (54)
e) vgl. Tabelle 14
f) geschätzter Wert



Figur 1

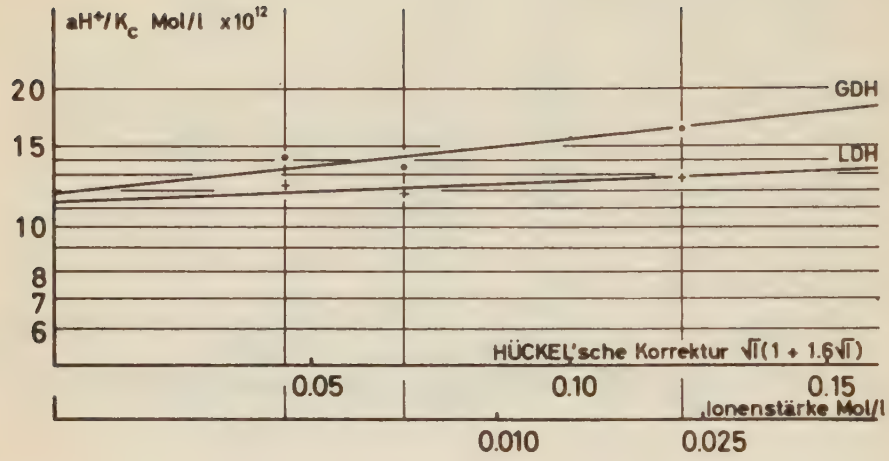
pH-unabhängige Gleichgewichtskonstanten (aH^+/K_c) und Ionenstärke (I) bei GDH- (•) und LDH-Reaktion (+) in KH_2PO_4-K_2HPO_4-Puffern bei 37° C, vgl. Tabellen 1 und 2.

Ausgleichung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate unter Berücksichtigung der statistischen Gewichte der Einzelwerte (Probitanalyse,[27])

Ausgleichungen

a) GDH-Reaktion $aH^+/K_{cG}\ 10^{12} = 10^{0,81\sqrt{I}/(1+1,6\sqrt{I})+0,87}$

b) LDH-Reaktion $aH^+/K_{cL}\ 10^{12} = 10^{-0,62\sqrt{I}/(1+1,6\sqrt{I})+1,075}$



Figur 2

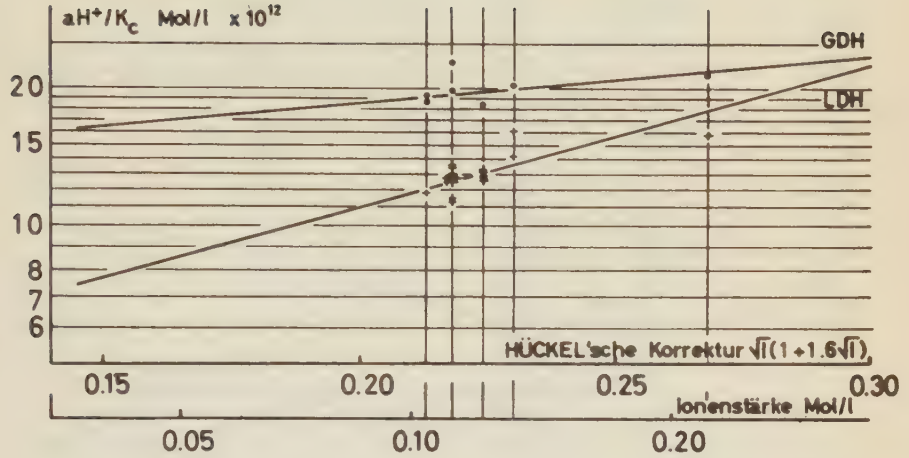
pH-unabhängige Gleichgewichtskonstanten (aH^+/K_c) und Ionenstärke (I) bei GDH- (•) und LDH-Reaktion (+) in Imidazol-Puffern bei 37° C, vgl. Tabellen 3 und 4.

Ausgleichung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (27).

Ausgleichungen

a) GDH-Reaktion $aH^+/K_{cG}\ 10^{12} = 10^{1,18\sqrt{I}/(1 + 1,6\sqrt{I}) + 1,075}$

b) LDH-Reaktion $aH^+/K_{cL}\ 10^{12} = 10^{0,344\sqrt{I}/(1 + 1,6\sqrt{I}) + 1,062}$



Figur 3

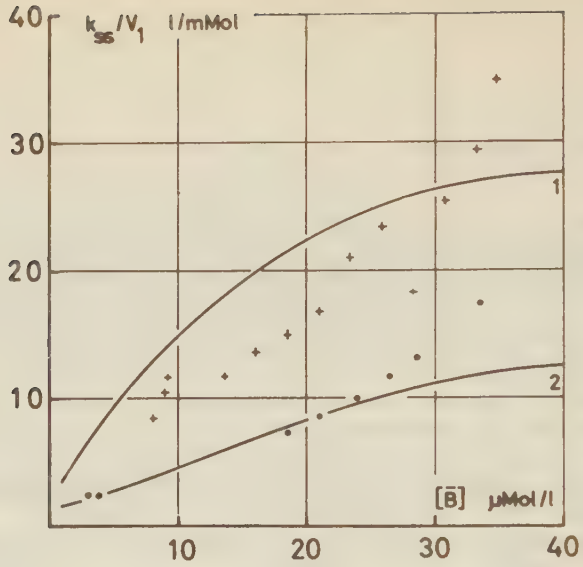
pH-unabhängige Gleichgewichtskonstante (aH^+/K_c) und Ionenstärke (I) bei GDH- (•) und LDH-Reaktion (+) in Imidazol-Puffern mit KCl bei 37° C, vgl. Tabellen 5 und 6.

Ausgleichung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate unter Berücksichtigung des gewogenen Mittels mehrfach besetzter Abszissenwerte (2+).

Ausgleichungen

a) GDH-Reaktion $aH^+/K_{cG}\ 10^{12} = 10^{1,05\sqrt{I}/(1\ +\ 1,6\sqrt{I})\ +\ 1,058}$

b) LDH-Reaktion $aH^+/K_{cL}\ 10^{12} = 10^{3,08\sqrt{I}/(1\ +\ 1,6\sqrt{I})\ +\ 0,422}$



Figur 4

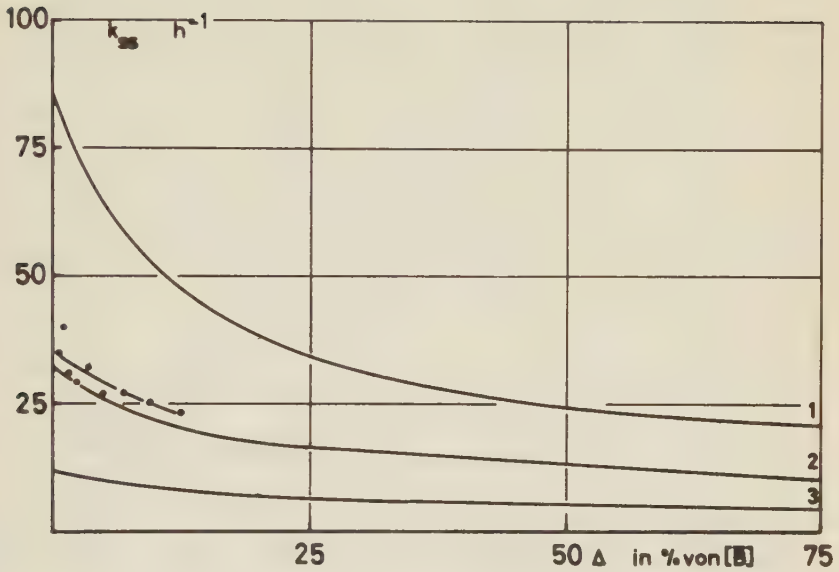
Auf die Enzymaktivität des Standardtestes bezogene Relaxationskonstanten (k_{ss}/V_1) und Gleichgewichtskonzentrationen ([B̄]) bei der GDH-Reaktion.

(•) Werte aus Tabelle 11, Nr. 5 } 37° C.
(+) Werte aus Tabelle 11, Nr. 9 }

Kurve 1 nach Gleichung (35) } 25° C.
Kurve 2 nach Gleichung (36) }

Nach Figur 4 ist die Relaxationskonstante eine abhängige Veränderliche der Gleichgewichtskonzentration.

Die Gleichgewichtsauslenkung Δ liegt in den Messungen (•) und (+) zwischen 0,5 und 3 % von [B̄]. Für die Reaktionen nach Kurve 1 und 2 ist Δ gleich Null gesetzt.



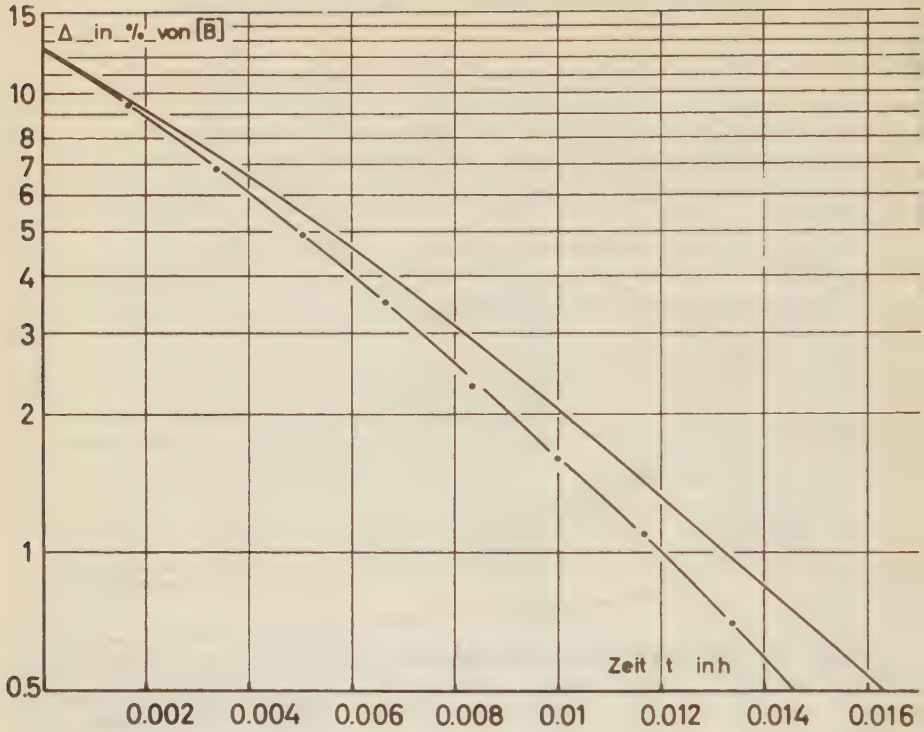
Figur 5

Relaxationskonstante (k_{ss}) und Gleichgewichtsauslenkung (Δ) bei der GDH-Reaktion. Enzymaktivität entsprechend V_1 = 3,8 mMol/l/h.

(•) Tabelle 11, Nr. 5, Zeile 5 umgerechnet für V_1 = 3,8 mMol/l/h, 37°.

Kurven 1 bis 3 berechnete Relaxationskonstanten (k_{ss}) für [B̄] 20 µMol/l, 25° C:
Kurve 1 nach Gleichung (35), Kurve 2 nach Gleichung (36) und Kurve 3 nach Gleichung (37).

Figur 5 zeigt die stärkere Abhängigkeit der Relaxationskonstanten von den Gleichgewichtsauslenkungen bei dem Ordered Bi Bi-Mechanismus der Vier-Partner-Reaktion.



Figur 6

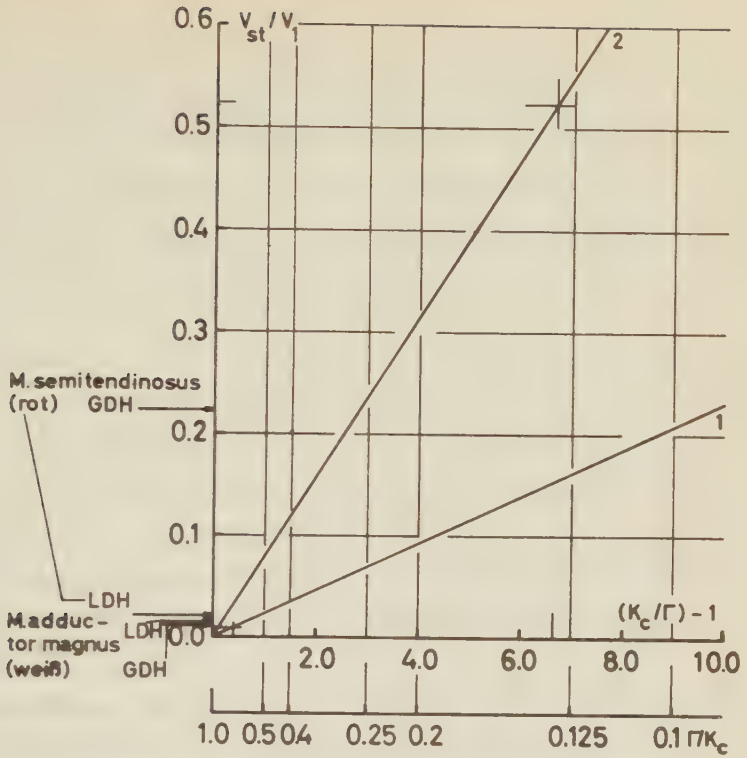
Zeitliche Änderung der Gleichgewichtsauslenkung (Δ), in Versuch (•) und Rekonstruktion aus den kinetischen Konstanten (Kurve).

(•) Versuch Nr. 5, Zeile 5 aus Tabelle 11, 37° C, Enzymaktivität V_1 11,4 mMol/l/h.

Ausgezogene Kurve für [B̄] 20 µMol/l, 25° C, vgl. Gleichung (35). Die nach dieser Gleichung für Gleichgewichtsauslenkungen von 0,5 bis 12,5 % von [B̄] mit 0,5 % -Stufen berechneten k_{ss} werden von V_1 3,8 mMol/l/h auf 11,4 mMol/l/h umgerechnet. Sodann bestimmt man nach

$$\lg \frac{\Delta_o}{\Delta_t} / k_{ss\ o} \cdot \lg e = t \qquad (56)$$

die Zeit t, nach der Δ_o von 12,5 auf 12,0, von 12,0 auf 11,5 % usw. abgefallen ist. Die entsprechenden Auslenkungen werden dann im semilogarithmischen Netz gegen die Zeiten aufgeschrieben.



Figur 7

Stromstärken und Ungleichgewichte der GDH-Reaktion in situ.

Pfeile rechts an der Ordinate V_{st}/V_1-Werte aus Tabelle 14.

Kurven 1 und 2 Rekonstruktionen mit in vitro-Daten.
Kurve 1 roter Muskel in Ruhe und nach 10 sec. tetanischer Kontraktion, vgl. Tabelle 15,
Kurve 2 roter Muskel in Ruhe mit $(k_{ss}/V_1)_{Exp.}$ = 2,0 l/mMol aus den Versuchen mit MDH, Tabelle 11, Nr. 12.

4. Diskussion

In dieser Arbeit sind einige Probleme ungelöst geblieben. Hierzu gehören die verschiedenen funktionalen Verknüpfungen zwischen Gleichgewichtskonstanten und Ionenstärken in den verschiedenen Puffern bei GDH- und LDH-Reaktion. Für die praktischen Aufgaben der Zellphysiologie genügt eine Bestimmung der Konstanten unter den jeweiligen Modellbedingungen. Die Wahl solcher Versuchsbedingungen ist allerdings dadurch erschwert, daß die zellulären Ionenstärken nicht genau genug bekannt sind. Die Aufklärung des exakten Zusammenhanges zwischen K_c und der DEBYE-HÜCKEL-Korrektur (HÜCKELschen Korrektur) ist vermutlich erst möglich, wenn Leitfähigkeitsmessungen in entsprechendem Milieu den Wert der Aktivitätskoeffizienten der einzelnen Reaktionspartner bestimmen lassen.

Ungeklärt ist die Frage des Reaktionsmechanismus der GDH-Reaktion Die vereinfachende Annahme eines Ordered Bi Bi-Mechanismus fügt sich im Endergebnis gut in die übrigen Überlegungen ein.

In den Rechnungen bedient sich diese Arbeit kinetischer Konstanten, die in orientierenden Messungen unter nicht völlig einheitlichen Bedingungen bei 25° C ermittelt wurden. Hier sind exakte Messungen bei 37° C unabdingbar, wenn die beiden Reaktionen weiter untersucht werden.

Die Relaxationskonstante ist eine ziemlich komplizierte Funktion

der Gleichgewichtsauslenkung. Die Relaxationsmessungen zeigen davon nur wenig. So gestattet die Einführung der Relaxationskonstanten die Betrachtung einer unübersichtlichen enzymatischen Reaktion innerhalb eines engeren Bereichs von Gleichgewichtsauslenkungen als Reaktion 1. Ordnung. Das ist ein wesentlicher Vorteil. Es bleibt allerdings zu fragen, wie weit dieser Nutzen die Ungenauigkeiten dieses Verfahrens ausgleichen kann.

Weitere Probleme stellen sich bei der Übertragung der in vitro-Relaxationen auf die Zellverhältnisse. Die stationäre Gleichgewichtsauslenkung Δ_{st} ist nicht unmittelbar zugänglich. Sie kann aus den analytischen Daten nur mit Hilfsannahmen errechnet werden. Dies Verfahren ist mit großen Unsicherheiten belastet. Die in vitro-Bedingungen sind dazu noch weit vom Zellmilieu entfernt. Der Zusatz NADH-bindender Proteine ist ein sehr unzulänglicher Ersatz für die Pufferung des NADH/NAD^+-Quotienten in der Zelle. Nichts ist über die Kinetik der NADH-Bindung bzw. -Freisetzung im zytoplasmatischen Lösungsraum bekannt. Versuche mit LDH und GDH gemeinsam mit allen Reaktionspartnern in einer Küvette scheinen hier von größtem Interesse. Bisher läßt sich der Einfluß dieser Faktoren auf den Durchsatz in der Zelle nicht abschätzen.

Die Theorie der Relaxationskonstanten und die vorgelegten Versuchsergebnisse gestatten eine gewisse Neuordnung der analytischen Daten. Die dadurch neu gewonnenen Informationen bedeuten nur einen geringen Fortschritt gegenüber den bisher verfügbaren.

5. Arbeitsmethoden

5.1 Reinigen der Geräte

Beim Arbeiten mit Enzymproteinen muß analytischer Sauberkeit aller Arbeitsgeräte besondere Aufmerksamkeit und Sorgfalt gewidmet werden.

5.11 Glasgeräte

5.111 Meßkolben, Meßzylinder und die zur Aufbewahrung der Substrat- und Enzymlösungen benutzten Glasfläschchen wurden mit Leitungswasser vorgespült, für 12 bis 14 Stunden im Kunststofftrog in mit Kalium bichromicum venale (MERCK) gesättigter chemisch reiner Schwefelsäure aufbewahrt, anschließend innen und außen 5 mal mit Leitungswasser gewaschen, 1 Stunde in einem sauberen, zugedeckten Kunststoffeimer mit Leitungswasser gewässert, je 3 mal mit Leitungswasser und demineralisiertem Wasser und 1 mal mit quarzdestilliertem Wasser aus- und abgespült, je nach Größe 2 bis 5 Minuten mit heißem, aus quarzdestilliertem Wasser erzeugten Wasserdampf ausgeblasen und zuletzt in einem Trockenschrank staubgeschützt getrocknet.

5.112 Pipetten wurden innen und außen mit Leitungswasser vorgespült, zu 3/4 mit Bichromat-Schwefelsäure gefüllt (dabei soll die Pipette mit ihrer Spitze etwa 5 cm weit eintauchen), nach Abfließenlassen der Schwefelsäure zum Mundstück hin unter geringem Druck aus einer Spritzflasche innen und außen von der Spitze zum Mundstück mit Leitungswasser, demineralisiertem und quarzdestilliertem Wasser mindestens je 5 mal gespült, unter 1 bis 2 Minuten Luftdurchsaugen getrocknet und zuletzt bis 3 cm unterhalb der Spitze, die nicht berührt werden soll, mit einem Kleenex-Tuch abgewischt.
Stangenpipetten unter 0,2 ml wurden nur mit Spitzen aus Polyäthylen benutzt. Diese Spitzen zogen wir aus Polyäthylenschlauch geeigneter lichter Weite über einer Leuchtgasflamme, sie wurden nur einmal gebraucht. Der Polyäthylenschlauch wurde zuvor 5 mal mit demineralisiertem und 2 mal quarzdestilliertem Wasser durchspült und dann durch Luftdurchsaugen getrocknet.

5.113 Küvetten wurden mit Leitungswasser vorgespült, mit Bichromat-Schwefelsäure gefüllt, nach 5 Minuten dauernder Einwirkung mit Leitungswasser, demineralisiertem und quarzdestilliertem Wasser je 5 mal aus- und abgespült, mit Kleenex außen abgetrocknet und zum Austrocknen warm aufgestellt.

An Stelle von Glasfläschchen wurden zur Aufbewahrung von Substrat- und Enzymlösungen auch die von NETHELER und HINZ hergestellten 0,5 und 1,5 ml-Polyäthylen-Zentrifugenbecherchen, neu analytisch sauber, benutzt. Nach einmaliger Benutzung wurden sie verworfen.

5.12 Kunststoffgeräte

5.121 Polyäthylenflaschen zur Aufbewahrung der Puffer-, Salz- und Titrisollösungen wurden nach Vorspülen mit Leitungswasser 1 bis 2 Minuten mit Bichromat-Schwefelsäure ausgeschwenkt, anschließend 10 mal mit Leitungswasser nachgespült, 24 Stunden in demineralisiertem Wasser gewässert, 5 mal mit demineralisiertem und 2 mal mit quarzdestilliertem Wasser ausgespült und nach 3 Minuten langem Ausblasen mit aus quarzdestilliertem Wasser erzeugten Heißdampf bei 60° C im Trockenschrank getrocknet.

5.122 Polyäthylen- und Gummiverschlüsse kleiner Glasgefäße wurden nach Vorspülen mit Leitungswasser einmal durch Bichromat-Schwefelsäure gezogen und dann je 10 mal mit Leitungswasser und demineralisiertem und 5 mal mit quarzdestilliertem Wasser nachgewaschen, zuletzt luftgetrocknet.

5.123 Teflonplümper zum Einrühren der Substrate und Enzyme in die Küvetten wurden vor jeder Versuchsserie durch Bichromat-Schwefelsäure gezogen und anschließend sorgfältig mit Leitungswasser, demineralisiertem sowie quarzdestilliertem Wasser nachgespült, zwischen den einzelnen Versuchen und nach jeder Benutzung aber nur kräftig mit quarzdestilliertem Wasser abgespritzt Anhaftende Tröpfchen wurden abgeschleudert.

5.2 Versuche mit GDH und LDH

5.21 Enzympräparate

5.211 GDH

Kristallisierte Glycerophosphat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel, Kristallsuspension mit 10 mg/ml (BOEHRINGER), spezif. Aktivität bei 25° C 2000 E/mg Biuretprotein.

5.2111 Für die Relaxationsexperimente wurden 0,05 ml der Kristallsuspension im 4° C-Raum mit vorgekühlter Pipette in ein 0,5 ml-Polyäthylen-Zentrifugenbecherchen gebracht, mit 0,01 ml kalter, an NH_4OH (p.A., MERCK) 50 mMol/l, gesättigter $(NH_4)_2SO_4$-Lösung (p.A., MERCK) versetzt, nach gründlichem Mischen 5 mal je 1 Minute im 4° C-Raum auf einer MISCO-Zentrifuge bei Stufe 110 (ca. 17000 U/min.) zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Sediment in 0,05 ml eiskaltem, quarzdestilliertem Wasser aufgenommen. Diese Enzymlösung e wurde zur Entfernung von denaturiertem Protein im 4° C-Raum 1 Minute auf der MISCO bei 110 zentrifugiert und der Überstand in ein neues Polyäthylen-Becherchen überführt. Diese Stammlösung wurde in geeigneter Verdünnung (etwa 1 : 400) ausgetestet in (vgl. 8): Triäthanolamin-HCl (BOEHRINGER) 50 mMol/l, EDTA (Titriplex III, p.A., MERCK) 5 mMol/l, NADH (Sigma grade, SIGMA) 0,15 mMol/l, DAP (BOEHRINGER) 0,4 mMol/l, 25° oder 37° C (je nach den Bedingungen des Relaxationsversuches), pH 7.60, d 1,0 cm, V 1,0 ml, Photometer EPPENDORF, 366 mμ, mit PHILIPS-Schreiber, Papiervorschub 2,0 cm/min.

5.2112 Für die fluorimetrische Titration wurden 1,5 ml der Kristallsuspension im 4° C-Raum mit vorgekühlter Pipette in ein 1,5 ml-Polyäthylen-Becherchen abpipettiert, 2 mal 1 Minute auf der MISCO bei 110 zentrifugiert; der Überstand wurde ver-

worfen, das Sediment in 1,5 ml eiskaltem 10 mMol/l KH_2PO_4-K_2HPO_4-Puffer (aus 1 Mol/l H_3PO_4, p.A., MERCK und KOH puriss. in rotulis, p.A., MERCK Nr. 5033, 1 n Lösung) mit 2 mMol/l EDTA, pH 7.5 aufgenommen. Diese Enzymlösung wurde 1 Minute auf der MISCO bei 110 zentrifugiert, der Überstand in einer Plexiglaskapsel durch eine Zellophanmembran 2 mal 5 Stunden im 4° C-Raum unter gründlichem Rühren gegen je 300 ml 10 mMol/l KH_2PO_4-K_2HPO_4-Puffer (vgl. oben) dialysiert. Nach der Dialyse wurde der Inhalt der Kapsel in ein 1,5 ml-Zentrifugenbecherchen überführt und 1 Minute bei 17000 U/min. auf der MISCO zentrifugiert. Der Überstand wurde bei den fluorimetrischen Titrationen vorgelegt, das Sediment verworfen. 0,3 ml des Überstandes dienten zur Bestimmung des Proteingehaltes nach der Biuretmethode ( ).

5.212 LDH
Kristallisierte Lactat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel, Kristallsuspension mit 5 mg/ml (BOEHRINGER).
Für die Relaxationsversuche wurde eine Enzymlösung analog 5.2111 präpariert und in geeigneter Verdünnung (etwa 1 : 400) ausgetestet in (vgl.):
Triäthanolamin-HCl 50 mMol/l, EDTA 5 mMol/l, NADH 0,15 mMol/l, Pyruvat (BOEHRINGER) 2,4 mMol/l, weiter wie 5.2111.

5.213 MDH
Kristallisierte Malat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel, Kristallsuspension mit 10 mg/ml (BOEHRINGER).
Für die fluorimetrische Titration und zur Bindung von NADH in den Relaxationsversuchen wurde eine Enzymlösung entsprechend 5.2112 präpariert.

5.22 Reaktionspartner
5.221 NADH
Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduziert, Dinatrium-Salz (BOEHRINGER, SIGMA Grade III), MG 793. 10 mg der Substanz wurden vor jeder Versuchsserie in 10 mMol/l KH_2PO_4-K_2HPO_4-Puffer gelöst, diese Stammlösung unverdünnt ausgetestet in (vgl.):
Triäthanolamin-HCl 50 mMol/l, EDTA 5 mMol/l, DAP 0,4 mMol/l, GDH 10 E/ml, NADH-Stammlösung ≙ 0,1 mMol/l NADH, w.w. 5.2111.

5.222 NAD^+
Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (BOEHRINGER, SIGMA), MG 765.
Die Substanz wurde in quarzdestilliertem Wasser gelöst und ausgetestet in (vgl.):
$Na_4P_2O_7$ (p.A., MERCK) 75 mMol/l, Semicarbazid-HCl (p.A., MERCK) 50 mMol/l, Glycocoll (n. SÖRENSEN, MERCK) 20 mMol/l, Äthanol (p.A., MERCK) 12 mMol/l, ADH (BOEHRINGER) 20 E/ml, NAD^+-Stammlösung in geeigneter Verdünnung, so daß ca. 0,02 mMol/l im Test; 25° C, pH 8.7, d 5,0 cm (Kleinküvette), V 2,0 ml; Photometer EPPENDORF, 366 mμ, PHILIPS-Schreiber, Papiervorschub 0,5 cm/min. Die ausgetestete Stammlösung wurde in Portionen zu 1,0 ml eingefroren und vor Gebrauch mit 1 n KOH auf pH 6.8 eingestellt.

5.223 DAP
Dihydroxyacetonphosphat, Dihexylamin-Salz, Dimethylketal-Monohydrat (CALBIOCHEM, BOEHRINGER), MG 432,5.
Die Substanz wurde in quarzdestilliertem Wasser gelöst und je 20 mg mit 0,4 ml trockenem Dowex 50 (200-400 mash) in H^+-Form versetzt, kurz umgerührt, über G 3-Fritte (SCHOTT & GEN.) filtriert, der Durchlauf in einem verschlossenen Gefäß im Wasserbad bei 40° C 4 Stunden hydrolysiert, mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung (p.A., MERCK) auf pH 4.8 eingestellt, auf die gewünschte Molarität verdünnt und ausgetestet in (vgl. 2.8):
Triäthanolamin-HCl 50 mMol/l, EDTA 5 mMol/l, NADH 0,15 mMol/l, GDH 10 E/ml, DAP-Stammlösung in geeigneter Verdünnung, so daß im Test ca. 0,1 mMol/l, 25° C, w.w. 5.2111. Die ausgetestete Lösung wurde in Portionen zu 1,0 ml eingefroren.

5.224 α-GP
D,L-α-Glycerophosphat, Natrium-Salz (FLUKA), MG als L-α-GP ca. 650. Die Substanz wurde in quarzdestilliertem Wasser gelöst und ausgetestet in (vgl. 2.8):
Hydraziniumsulfat (p.A., MERCK) 200 mMol/l, Glycocoll 500 mMol/l, EDTA 2,5 mMol/l, NAD^+ 2,5 mMol/l, GDH 200 E/ml, α-GP-Stammlösung in geeigneter Verdünnung, so daß im Test 0,02 mMol/l α-GP; 25° C, pH 9.5, d 5,0 cm (Kleinküvette), V 2,0 ml; Photometer EPPENDORF, 366 mμ, PHILIPS-Schreiber, Papiervorschub 0,5 cm/min. Die ausgetestete Stammlösung wurde in Portionen zu 1,0 ml eingefroren.

5.225 Pyruvat
Natriumpyruvat (BOEHRINGER), MG 114.
Die Substanz wurde in quarzdestilliertem Wasser vor jeder Versuchsserie frisch gelöst und ausgetestet in (vgl. 2.8):
Triäthanolamin-HCl 50 mMol/l, EDTA 5 mMol/l, NADH 0,15 mMol/l, LDH 10 E/ml, Pyruvat-Stammlösung in geeigneter Verdünnung, so daß im Test ca. 0,1 mMol/l; 25° C, w.w. 5.2111

5.226 Lactat
L-Calciumlactat (CALBIOCHEM).
Die Substanz wurde in quarzdestilliertem Wasser gelöst, das Calcium mit einer berechneten Na-Oxalatmenge (p.A., MERCK) quantitativ gefällt, der Niederschlag abzentrifugiert, der Überstand auf Freiheit von Ca^{++} gegen eine Na-Oxalatlösung getüpfelt und ausgetestet in (vgl. 2.8):
Hydraziniumsulfat 200 mMol/l, Glycocoll 500 mMol/l, EDTA 2,5 mMol/l, NAD 2,5 mMol/l, LDH 200 E/ml, Lactat-Stammlösung in geeigneter Verdünnung, so daß im Test 0,02 mMol/l; 25° C, w.w. 5.224. Die ausgetestete Stammlösung wurde in Portionen zu 1,0 ml eingefroren

5.23 Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten
5.231 Pufferlösungen
Imidazol-Puffer (Tab. 3 bis 6). Imidazol 2 mal aus Benzol umkristallisiert. Die Puffer waren an Imidazol 12,5 und 50,0 mMol/l. In den 50 mMol/l Imidazol-Puffern wurden verschiedene Salze (Tab. 5 und 6) gelöst (alles p.A.-Substanzen, MERCK). Das pH wurde mit 1 n HCl (Titrisol, MERCK) eingestellt.

KH_2PO_4-K_2HPO_4-Puffer wurden aus 0,92 n KOH (aus KOH puriss. in rotulis p.A., MERCK) und 1 Mol/l H_3PO_4 (Orthophosphorsäure p.A., MERCK, MG 98,0, Dichte 1,71, mindestens 85 %) nach A.A. GREEN (15) zubereitet (Tab. 1 u. 2).

5.232 Ansatz
6,000 ml Puffer wurden in eine Küvette mit d 4,0 cm einpipettiert. NAD^+ und α-GP bzw. NAD^+ und Lac wurden entsprechend je etwa 1 mMol/l im Test zugesetzt. Nach Temperierung auf 37° C im Photometer EPPENDORF wurden ca. 10 E/ml GDH bzw. LDH eingerührt und die Kinetik bis zur Einstellung des Gleichgewichts bei 334 mμ registriert. Durch Multiplikation mit 0,0411 ergeben sich aus den Extinktionsdifferenzen die Gleichgewichtskonzentrationen von NADH und DAP bzw. NADH und Pyr in μMol/l. Nach jedem Versuch wurde das pH mit einer Glaselektrode und dem KNICK-pH-Meter bei 37° C gemessen. Als Eichpuffer diente ein 25 mMol/l NaH_2PO_4-K_2HPO_4-Puffer, pH 7.2.

5.24 Relaxationsversuche in KH_2PO_4-K_2HPO_4-Puffern

5.241 Typ I (Tab. 11 Nr. 1, 2, 3, 6, 7, 10 u. Tab. 12 Nr. 1, 2, 3, 4). Das Versuchsschema ähnelt 5.232, jedoch wurde nach Einstellung des Gleichgewichts eine 4-fache Skalenexpansion am Linearisierungsglied des Registriergerätes eingestellt (Vollausschlag ΔE 0,250). Dann wurde in die Küvette NADH entsprechend 2,2 μMol/l eingerührt und die Kinetik wieder bis zur Gleichgewichtseinstellung bei 334 mμ registriert. Für beide Kinetiken wurde ein ΔE_o entsprechend den %-Angaben der Tabellen 11 und 12 gewählt und ΔE-Werte für t_1, t_2, ... t_n entnommen. Die ΔE wurden gegen t_o, t_1, ... im semilogarithmischen Netz aufgetragen (vgl. Figur 6). Es wurde $\Delta E_o/e$ gebildet und in der Auftragung der zugehörige Wert von t aufgesucht. Er entspricht $1/k_{ss}$. Für die Tabellen 11 und 12 wurde der Quotient k_{ss}/V_1 angegeben. V_1 ist die in E/ml oder mMol/l/h ausgedrückte Enzymaktivität des Relaxationsversuches im Standardtest (5.2111 und 5.212).

5.242 Typ II (Tabelle 11 Nr. 4,5, 8,9). Versuchsschema und Auswertung entsprechen 5.241, jedoch wurden für die Partnerkonzentrationen den zellulären Verhältnissen angenäherte Werte gewählt. In Nr. 5 und 9 wurde mehrfach NADH eingerührt.

5.243 Typ III (Tab. 11 Nr. 11 und Tab. 12 Nr. 5). Für diese Versuche wurden DAP, α-GP und NAD^+ bzw. Pyr, Lac und NAD^+ in den zellulären Verhältnissen ähnlicher Konzentration vorgegeben. Nach Einstellung des Gleichgewichtes durch Zugabe von GDH bzw. LDH wurde eine stöchiometrische Menge MDH zugesetzt und die Kinetik der Gleichgewichtsverschiebung bis zur Einstellung des neuen Gleichgewichtes bei 334 mμ und 25° C registriert. Die Skala war 4-fach gedehnt, d 2,0 cm. Anschließend wurden DAP bzw.

Pyr zugesetzt und die Kinetik bis zur Einstellung des Gleichgewichts verfolgt. Die Auswertung wurde wie unter 5.241 beschrieben vorgenommen.

5.244 Typ IV (Tabelle 11 Nr. 12). Das Versuchsschema ähnelt Typ III, jedoch wurden die Kinetiken mit einem von H. BÜCHER gebauten Zweistrahl-Photometer mit Differenzschreibung 405 gegen 366 mμ verfolgt. Das Verfahren gestattet 100-fache Skalenexpansion und damit die Erfassung der dem Zusatz von MDH vorangehenden Gleichgewichtseinstellung.

5.25 Kinetische Konstanten

Die in der Tabelle 10 wiedergegebenen kinetische Konstanten wurden nach orientierenden Versuchen mit Messung der Anfangsgeschwindigkeiten, ausgewertet nach FLORINI und VESTLING (14), berechnet. Registrierung am Photometer EPPENDORF mit PHILIPS-Schreiber bei 366 mμ, 25° C.

Die Dissoziationskonstanten des MDH-NADH- und des GDH-NADH-Komplexes wurden durch fluorimetrische Titrationen bestimmt (vgl. 6, dort auch weitere Literatur). Bei der GDH entfallen auf 4,0 μMol/l vorgelegtes Enzymprotein (bei MG 70000) 6,6 μMol/l gebundenes NADH. Die Auswertung ergibt einen sprunglosen Verlauf: Die Bindungsorte scheinen also gleichberechtigt.

Die Dissoziationskonstante des GDH-NAD^+-Komplexes läßt sich bestimmen, wenn bei der Titration zusammen mit der GDH NAD^+ vorgelegt wird. Für den Äquivalenzpunkt gilt

$$K_{IQ} = \frac{\Sigma NAD^+ \cdot K_{IA} \, (\Sigma NADH - [NADH])}{[NADH]^2 - K_{IA} \, (\Sigma NADH - [NADH])} \qquad (37)$$

[NADH] freies NADH im Äquivalenzpunkt
ΣNADH Gesamtmenge NADH im Äquivalenzpunkt

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit versucht, für GDH- und LDH-Reaktion im roten und weißen Muskel des Hauskaninchens die Ergebnisse der Metabolitanalysen und die Enzymaktivitätsmuster einander sinnvoll zuzuordnen. Dazu werden die unter Modellbedingungen in vitro bestimmten Relaxations- und Gleichgewichtskonstanten beider enzymatischer Reaktionen herangezogen. Trotz nur geringerer Annäherung des Modells an das Zellmilieu führen diese Rekonstruktionen bei der GDH-Reaktion im roten Skelettmuskel zu einer weitgehenderen Korrespondenz der verschiedenen Resultate in ihren Proportionen. Zugleich ist es möglich, das Ausmaß des Ungleichgewichtes der betreffenden Reaktionen in der Zelle abzuschätzen.

Die Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten der behandelten enzymatischen Reaktionen von der Ionenstärke wird diskutiert. Die Theorie der Relaxationskonstanten des Ordered Di Bi-Mechanismus der enzymatischen Vier-Partner-Reaktion wird eingehend behandelt.

7. Schrifttum

1) BEISENHERZ, G., H. J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT, G. PFLEIDERER:
Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskel in einem Arbeitsgang. Z. Naturforschg. 8 b, 555 (1953)

2) BERGMEYER, H. U., Hrsg.:
Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim 1962.

3) BERTALANFFY, L. v.:
Biophysik des Fließgleichgewichts. Sammlung Vieweg, Braunschweig 1953.

4) BORST, P.:
Hydrogen transport and transport metabolites. In P. KARLSON, Hrsg.: Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle, S. 137, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963.

5) BRIGGS, G. E., J. B. S. HALDANE:
A note on the kinetics of enzyme action. Biochem. J. 19, 338 (1925).

6) BÜCHER, Th.:
Redoxbeziehungen des α-Glycerophosphat. S. Ber. Ges. Beförd. ges. Naturwiss. Marburg 83/84, 383 (1963).

7) BÜCHER, Th., M. KLINGENBERG:
Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation. Angew. Chemie 70, 552 (1958).

8) BÜCHER, Th., W. LUH, D. PETTE:
Einfache und zusammengesetzte optische Tests mit Pyridinnukleotiden. In HOPPE-SEYLER und THIERFELDER: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Aufl. Bd. VI A, S. 292, besonders 304, 306, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964.

9) BÜCHER, Th., W. RÜSSMANN:
Gleichgewicht und Ungleichgewicht im System der Glykolyse. Angew. Chemie 75, 881 (1963) und International Edition 3, 426 (1964).

10) BURTON, K., T. H. WILSON:
The free-energy changes for the reduction of diphosphopyridine nucleotide and the dehydrogenation of l-malate and l-glycerol-1-phosphate. Biochem. J. 54, 86 (1953).

11) CLARKE, H. B., S. P. DATTA, B. R. RABIN:
Thermodynamic quantities for the dissociation equilibria of biologically important compounds. V. The second acid dissociation of 2-aminoethanol-1-phosphoric acid. Biochem. J. 59, 209 (1955).

12) CLELAND, W. W.:
The kinetics of enzyme katalysed reactions with two or more substrates and products. I. Nomenclature and rate equations. Biochim. biophys. Acta 67, 104 (1963).

13) DEBYE, P., E. HÜCKEL:
Zur Theorie der Elektrolyte. I. Gefrierpunkserniedrigung und verwandte Erscheinungen, Physik. Z. 24, 185 (1923) und II. Das Grenzgesetz für die elektrische Leitfähigkeit, Physik. Z. 24, 305 (1923).

14) FLORINI, R., V. S. VESTLING:
Graphical determination of the dissociation konstants for two-substrate enzyme systems. Biochim. biophys. Acta 25, 575 (1957).

15) GREEN, A. A.:
zitiert nach(41).

16) HALDANE, J. B. S.:
Enzymes. London 1930.

17) HAKALA, M. T., A. J. GLAID, G. W. SCHWERT:
Lactic dehydrogenase. II. Variation of kinetic and equilibrium constants with temperature. J. biol. Chem. 221, 191 (1956).

18) HAMMES, G. G., R. A. ALBERTY:
The relaxation spectra of simple enzymatic mechanisms. J. Amer. chem. Soc. 82, 1564 (1960).

19) HOHORST, H. J.:
Der Reduktionszustand des Diphosphopyridin-Nukleotidsystems in lebendem Gewebe. Eine Studie über Metabolitgleichgewichte in der Rattenleberzelle. Dissertation, Marburg 1960.

20) HOHORST, H. J.:
Einige Bemerkungen über Metabolitgleichgewichte und Strukturen im cytoplasmatischen Lösungsraum. In P. KARLSON, Hrsg.: Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle, S. 194, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963.

21) HOHORST, H. J., F. H. KREUTZ, Th. BÜCHER:
Über Metabolitgehalte und Metabolitkonzentrationen in der Leber. Biochem. Z. 332, 18 (1959).

22) HOHORST, H. J., F. H. KREUTZ, M. REIM:
Steady state equilibria of some DPN-linked reactions and the oxidation/reduction state of the DPN/DPNH system in the cytoplasmatic compartment of liver cells in vivo. Biochim. biophys. Res. Comm. 4, 159 (1961).

23) HOLLDORF, A. W.:
Gleichgewichtskonstanten, Freie Energien und Redoxpotentiale biologisch wichtiger Reaktionen. In H. M. RAUEN, Hrsg.: Biochemisches Taschenbuch, 2. Aufl. Bd. II, S. 125, 140, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York 1964.

24) HÜCKEL, E.:
Zur Theorie der Elektrolyte. Ergebn. exakt. Naturwiss. 3, 199, (1924), bes. S. 240 ff.

25) HÜCKEL, E.:
Zur Theorie starker wässeriger Lösungen starker Elektrolyte. Physik. Z. 26, 93 (1925).

26) KOLB, E.:
Körper- und Zellbestandteile. I.Allgemeines und Hauptorgane. In H. M. RAUEN, Hrsg.: Biochemisches Taschenbuch, 2. Aufl., Bd. II, S. 389, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York 1964.

27) KOLLER, S.:
Statistische Auswertungsmethoden. In. H. M. RAUEN, Hrsg.: Biochemisches Taschenbuch, 2. Aufl., Bd. II, S. 959 ff., Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York 1964.

28) KRIEG, U.:
Dissertation, München, in Vorbereitung.

29) KUHN, W.:
Optische Spezifität von Enzymen. Ergebn. Enzymforschg. 5, 1 (1936), bes. S. 39.

30) MICHAELIS, L., M. L. MENTEN:
Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. Z. 49, 333 (1913).

31) NETTER, H.:
Theoretische Biochemie. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959.

32) NETTER, H.:
Theoretische Biochemie, S. 144.

33) NETTER, H.:
Theoretische Biochemie, S. 157.

34) NETTER, H.:
Theoretische Biochemie, S. 337.

35) PETTE, D.:
Plan und Muster im zellulären Stoffwechsel. Naturwiss. 52, 297 (1965).

36) PETTE, D., Th. BÜCHER:
Proportionskonstante Gruppen in Beziehung zur Differenzierung der Enzymaktivitätsmuster von Skelettmuskeln des Kaninchens. HOPPE-SEYLER's Z. f. physiol. Chem. 331, 180 (1963).

37) RAUEN, H. M., Hrsg.:
Biochemisches Taschenbuch, 2. Aufl., Bd. I, S. 195, 198, 234, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York 1964.

38) RODKEY, F. L.:
The effect of temperature on the oxidation-reduction potential of the diphosphopyridine nucleotide system. J. biol. Chem. 234, 188 (1959).

39) SCHIMASSEK, H., B. KADENBACH, W. RÜSSMANN, Th. [illegible]:
The oxidation of α-glycerophosphate: a possible example of metabolic control by enzymic induction. In G. WEBER, Hrsg.: Adv. in Enzyme Regulation 1, 103 (1963).

40) SIES, H.:
Dissertation, München, in Vorbereitung.

41) STAUFF, J., R. JAENICKE:
Physikalische Chemie der Lösungen. In H. M. RAUEN, Hrsg.: Biochemisches Taschenbuch, 2. Aufl., Bd. II, S. 48, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York 1964.

42) TAKENAKA, Y., G. W. SCHWERT:
Lactic dehydrogenase. III. Mechanism of the reaction. J. biol Chem. 223, 157 (1956).

Lebenslauf

Am 15. September 1939 wurde ich, Walter Rüßmann, als Sohn des Amtsgerichtsdirektors Dr. Karl Rüßmann und seiner Ehefrau Hermine, geb. Ehlis, in Wuppertal-Elberfeld geboren.

Von Ostern 1946 bis 1950 besuchte ich die Volksschule, anschließend das staatliche neusprachliche Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium in Remscheid. Im März 1959 bestand ich die Reifeprüfung und die Ergänzungsprüfung im Altgriechischen.

Im Sommersemester 1959 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Universität Tübingen. Für das Studienjahr 1959/60 wurde ich in das Leibniz-Kolleg der Universität Tübingen aufgenommen. Im Oktober 1960 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab, im April 1962 die ärztliche.

Während der beiden ersten klinischen Semester studierte ich in Marburg, vom Sommersemester 1963 an in Düsseldorf. Hier bestand ich im Wintersemester 1965/66 die ärztliche Prüfung.

Seit dem 1. Februar 1966 arbeite ich als Medizinalassistent.

In meinem Studium wurde ich vom Sommersemester 1960 an von der Studienstiftung des deutschen Volkes gefördert.